



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AQUICULTURA

**Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão
proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Afonso Celso Dias Bainy

Fabício Flores Nunes

FLORIANÓPOLIS
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nunes, Fabrício Flores

Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário / Fabrício Flores Nunes ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy - Florianópolis, SC, 2013.

183 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Crassostrea gigas*. 3. Esgoto sanitário. 4. Alquilbenzenos lineares. 5. Biomarcadores. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário

Por

FABRÍCIO FLORES NUNES

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

Dr. Augusto Cesar

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Dr. Guilherme Razzera Maciel

Dra. Márcia Caruso Bicego

Dedico esta tese
À aquicultura em águas abrigadas e sua importância socioeconômica,
À minha filha, Maria Catarina e, minha companheira, Laura,
E à minha família, em especial minha mãe Lena.

Agradecimentos

Durante esses cinco anos, envolvido na geração de dados compilados e na redação da minha tese de doutoramento, tenho a plena certeza que esta conquista vai além dos meus investimentos em tempo e esforço intelectual. As relações humanas criadas nesses cinco anos, o apoio científico imensurável e os *brainstormings* existenciais foram essenciais para um Norte Magnético nesse período. Tenho ciência e convicção que este documento foi possível devido à emocionante capacidade humana do auxílio e na vivência verdadeira de companheirismo. Por essa razão, meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador e amigo colorado, Prof. Dr. Afonso Bainy, que ao final do mestrado, demonstrara o interesse na continuidade das pesquisas que possibilitaram meu doutoramento. Pelo apoio, confiança, credibilidade, liberdade e amizade. Obrigado!

Ao amigo Marcelo Cipriani, peça fundamental no início do meu doutoramento. Pelo apoio e amizade. “Dazumbanho!”

Aos meus pais e irmãs, meus portos seguros que me fornecem amor verdadeiro e incentivo constante.

À minha filha Maria Catarina, que me faz pensar muito em tudo. Pela magia, amor verdadeiro, companhia, amizade e carinho. Te amo!

A Laura, minha companheira de Caminhada, mochileira, jornalista de mão-cheia, meu orgulho. Mulher Verdadeira, que pôs “estrelas em meus olhos e música em meus ouvidos”, muitas vezes guiando meus passos que me levaram ao mundo rico de detalhes a que sempre pertenci. Por tudo que vivemos nestes quatro anos e alguns meses e por teu amor-verdadeiro: Obrigado, Lalá! *Walking together forever! LovU!*

À minha segunda família, Léa, Telêmaco, Juliano-Clá-João Francisco, pelo apoio, auxílio e presença constante durante esta trajetória. Em especial para a minha sogra, Léa, pelo apoio incondicional, correções e sugestões na elaboração desta tese e artigos científicos. Obrigado!

Aos amigos do peito Sid e Andrey, pela amizade verdadeira e apoio constante.

Aos pesquisadores companheiros, em especial aos que possibilitaram a geração destas informações, por me acompanharem nas jornadas de trabalho e nos delineamentos delirantes. Um “upa” pra lá de especial para o Jacó-93, Lila, mana Flávia, Gui, Ju, Clei, Roberta, Miguel e Álvaro.

Ao grupo do LMM, pelo apoio técnico, fornecimento de ostras, microalgas e aclimações. Cláudio, Tatu, Chico e Jacque, obrigado!

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Orgânica (IO-USP), Dra. Márcia Bícego, Satie e Silvio. Pelo pronto atendimento, análises de contaminantes orgânico e material disponibilizado.

Aos demais pesquisadores do grupo do LABCAI, os atuais e os que por ali passaram, vivenciando comigo a loucura destes cinco anos; pelos delineamentos desafiadores, unidades experimentais mirabolantes, pelos churrascos, cervejadas, infinitos litros de café e papo bom.

À equipe LABCAI do projeto *Avaliação de biomarcadores bioquímicos, moleculares, histológicos e citogenéticos de contaminação aquática para a indústria do petróleo* (PETROBRAS), que salvaguardaram minha ausência nos últimos meses para a conclusão desta tese. Em especial, agradeço ao Prof. Afonso, a Lila e ao Jacó.

Ao Dr. Juliano Zanette (FURG), Dra. Karim Luchmann (UDESC) e Dr. Igor Medeiros (UNIFESP) pela parceria, amizade, apoio, inspiração e orientações.

À Profa. Dra. Maria João Bebianno, minha orientadora durante o doutoramento sanduíche na Universidade do Algarve (Faro, Portugal), pelo aceite da orientação, amizade, confiança, liberdade e apoio. Beijo no coração!

Aos meus tios e primas, Ricardo, Alice, Aline e Dani, presença constante durante minha estada em Portugal. Obrigado pela segurança, amor e apoio. Amo vocês!

Aos amigos portugueses da UAlg: Chico, Maria, Tânia, Rui, Vera, Catarina, Angela e Zélia. Um obrigado especial para Cátia, Tina e Isabel, pelo eterno atendimento solícito e pela manutenção dos meus níveis de cafeína durante esse período. Aos amigos lusos-e-brasileiros, Márcia, Hélder, Ju, Rodrigo, Rosa e Wellington, pelas conversas e noites cosmopolitas no Bairro Alto.

Ao Dr. Denis Abessa (UNESP), pelo envio de artigos, que complementaram minhas pesquisas bibliográficas, através de seu acesso imensurável aos periódicos inacessíveis pelo sistema da UFSC. Obrigado!

Ao CNPq, pela bolsa de doutoramento no Brasil (Edital MCT/CNPq/CT-Hidro nº 22/2009 – Processo 556553/2009-8) e pelo financiamento parcial da pesquisa (Edital CNPq MAPA/DAS – Processo 578200/2008-2).

À CAPES, pela bolsa de doutoramento PDEE que possibilitou realizar parte da minha tese em Portugal (Processo 1452-10-0).

À PETROBRAS, FINEP e INCT-TA/CNPq, pelo financiamento indireto por meio do fornecimento de infraestrutura ao LABCAI.

Ao secretário do PPGAQI, Carlito Klunk, pela dedicação, amizade, atenção e ajuda.

Aos professores do PPGAQI, pelas orientações, informações, sugestões e disciplinas que ajudaram na escrita desta tese.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e disponibilidade em ceder tempo e esforço para contribuir com esta tese e com a minha formação.

E, finalmente, ao surf, ao chimarrão e aos livros, que mantêm minha mente sã.

"They did not know it was impossible, so they did it!"

Mark Twain (1835-1910)

Resumo

O crescimento demográfico mundial em regiões costeiras tem causado uma série de ameaças à qualidade de vida de organismos estuarinos e marinhos, particularmente pelo lançamento de efluentes contendo esgoto sanitário. Este fato tem também posto em risco o desenvolvimento de atividades relacionadas à maricultura. A complexidade de estimar o impacto do esgoto sanitário em áreas costeiras está relacionada com a variabilidade de sua composição e volume. Análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares em ostras têm sido propostas porque estes organismos-sentinelas são sésseis, filtradores e bioacumuladores de contaminantes. *Crassostrea gigas* é o principal e mais estudado bivalve marinho cultivado no mundo. Análises de biomarcadores nos animais expostos auxiliam na avaliação dos efeitos tóxicos e riscos de exposição aos xenobióticos presentes no ambiente. Técnicas de qRT-PCR, proteômicas e de análises enzimáticas podem ser utilizadas para elucidação de respostas dos organismos frente à exposição aos contaminantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes respostas moleculares e bioquímicas da ostra *C. gigas* frente à exposição ao esgoto sanitário e alquilbenzenos lineares (LABs), a fim de identificar e validar potenciais novos biomarcadores de exposição. Ostras expostas *in situ* em ambiente contaminado por esgoto sanitário bioacumularam principalmente HPAs e LABs. Os genes *FABP* e *GST-Ω* se apresentam como potenciais biomarcadores moleculares de exposição ao esgoto sanitário. Em nível proteômico, as respostas observadas sugerem que a exposição ao esgoto sanitário pode promover apoptose e interferências no sistema imune das ostras. Apesar da capacidade da ostra *C. gigas* em bioacumular LABs, esse poluente parece não ser o responsável pelas respostas transcricionais observadas em ostras expostas ao esgoto sanitário. As alterações observadas na atividade das enzimas dos animais expostos aos LABs sugerem uma adaptação das enzimas auxiliares do sistema antioxidante enzimático para compensar um possível estado pró-oxidante intracelular gerado pela exposição a esses compostos. A necessidade de informações sobre a influência dos contaminantes na ativação de vias metabólicas específicas em moluscos bivalves torna-se fundamental para a compreensão da modulação da transcrição gênica, das respostas observadas em biomarcadores moleculares/bioquímicos e interação entre as respostas observadas.

Palavras-chave: Esgoto sanitário, *Crassostrea gigas*, PCR em tempo real, Enzimas antioxidante, Análises proteômicas.

Evaluation of biochemical and molecular responses and protein expression in oysters *Crassostrea gigas* exposed to sanitary sewage

Abstract

The world population growth in coastal regions has caused a number of threats to the quality of life of estuarine and marine organisms, particularly caused by the discharge of effluents containing wastewater. This fact has also jeopardized the development of activities related to mariculture. The complexity of estimating the impact of wastewater in coastal areas is related to the variability of its composition and volume. Analysis of biochemical and molecular biomarkers in oysters has been proposed because these sentinel organisms are sessile, filter feeding and bio-accumulators of contaminants. *Crassostrea gigas* is the principal and most studied marine bivalve cultivated worldwide. Analysis of biomarkers in animals exposed to wastewater effluents helps in the evaluation of toxic effects and risk of exposure to xenobiotics present in the environment. QRT-PCR techniques, proteomic analysis and enzyme assays can be used to elucidate responses of organisms following exposure to contaminants. The aim of this study was to evaluate different biochemical and molecular responses of the oyster *C. gigas* against exposure to sewage or linear alkylbenzenes (LABs) in order to identify and validate potential new biomarker of exposure. Oysters exposed *in situ* to an environment contaminated by sewage bio-accumulate primarily PAHs and LABs. The FABP genes and GST- Ω are presented as potential molecular biomarkers of exposure to sewage. At proteomic level, the observed responses suggest that exposure to sewage can promote apoptosis and interference in the oysters immune system. Despite the ability of the oyster *C. gigas* bioaccumulate LABs, this pollutant does not seem to be responsible for the transcriptional responses observed in oysters exposed to sewage. The observed changes in the enzyme activities of animals exposed to LABs suggest an adaptation of the auxiliary enzymes from the antioxidant system to compensate for a possible intracellular pro-oxidant state generated by exposure to these compounds. The need for information on the influence of contaminants in the activation of specific metabolic pathways in bivalve mollusks is fundamental for understanding the modulation of gene transcription, the responses observed in biomarkers molecular / biochemical and interaction between observed responses.

Keywords: Sanitary sewage, *Crassostrea gigas*, Real-time PCR, Antioxidant enzymes, Proteomic analyzes.

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

Figura 1 - Origem, pressões, situação e impactos das megacidades na zona costeira. (modificado de SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012). 25

Figura 2 - Mapa global do impacto antrópico em 20 tipos de ecossistemas costeiros e oceânicos. Em destaque as regiões fortemente impactadas no Caribe, no Mar do Norte, e em águas japonesas, e uma das menos impactadas (no quadrado à direita) na Austrália. Os números referem-se à escala de impacto acumulado definida pelos autores, variando do menos impactado (azul) ao mais impactado (vermelho). (modificado de HALPERN et al., 2008). 27

Figura 3 - Mapa do crescimento relativo da população e ausência de esgotamento sanitário. Os pontos pretos no mapa representam os municípios sem rede de esgotamento sanitário. As regiões Sul e Nordeste se destacam em relação às cidades litorâneas. (Fonte: IBGE, 2011). 28

CAPÍTULO II

Figura 1 - Locais de estudo utilizados para o transplante das ostras na região das baías da Grande Florianópolis. 1- Praia do Sambaqui; 2- Praia de Santo Antônio de Lisboa; 3- Foz do Rio Bücheler; 4- Praia do Ribeirão da Ilha. 45

Figura 2 - Mini-balsa utilizada para a manutenção das ostras durante a exposição in situ nos diferentes locais. 45

Figura 3 - Indicadores de qualidade analisados em amostras de água do mar obtidas no início (Tzero), 24h e após 14 dias de exposição no campo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler. 51

Figura 4 - Níveis de contaminantes orgânicos detectados em amostras de sedimento coletadas nos locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bucheler. 52

Figura 5 - Níveis de Coprostanol e relação entre esteróis encontrados em sedimento dos diferentes locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler..... 52

Figura 6 - Níveis de contaminantes orgânicos bioacumulados em ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias nos diferentes locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler. 53

Figura 7 - Transcrição de genes de amostras de glândula digestiva de *Crassostrea gigas* expostas 24 horas in situ em diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina. RIB: Ribeirão da Ilha, cultivo baía Sul; LIS: Santo Antônio de Lisboa, cultivo baía Norte; BUC: rio Bücheler, controle positivo. Letras maiúsculas representam a estatística entre RIB e BUC. Letras minúsculas representam a estatística entre LIS e BUC. ($p < 0,05$)..... 56

Figura 8 - Transcrição de genes de amostras de brânquias de *Crassostrea gigas* expostas 24 horas in situ em diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina. RIB: Ribeirão da Ilha, cultivo baía Sul; LIS: Santo Antônio de Lisboa, cultivo baía Norte; BÜC: rio Bücheler, controle positivo. Letras maiúsculas representam a estatística entre RIB e BUC. Letras minúsculas representam a estatística entre LIS e BUC. ($p < 0,05$)..... 57

CAPÍTULO III

Figura 1 - Locais de estudo utilizados para o transplante das ostras na região das baías da Grande Florianópolis. 1-SAM: Sambaqui - LMM/UFSC (origem das ostras); 2- LIS: Santo Antônio de Lisboa; 3- RIB: Ribeirão da Ilha; 4- BUC: Rio Bücheler..... 94

Figura 2 - Diagrama de Venn com a interação entre os PEPs de cada local de estudo. Spots encontrados apenas no ponto contaminado e em comum entre os dois experimentos ($p < 0,05$). 102

Figura 3 - Diagrama de Venn com spots específicos de cada tratamento (poluído x cultivo) e em comum entre eles ($p < 0,05$). 102

Figura 4 - Diagrama de Venn com spots de interesse relacionados com as proteínas expressas em menor quantidade (A) e em maior quantidade (B) em comum entre os experimentos (BÜC x RIB e BÜC x LIS). 103

Figura 5 - Gel mestre representativo da assinatura de expressão proteica (PESs) com a localização das proteínas expressas em menor quantidade -2x ($p < 0,05$). 104

Figura 6 - Gel mestre representativo da assinatura de expressão proteica (PESs) com a localização das proteínas expressas em maior quantidade +2x ($p < 0,05$). 105

Figura 7 - Análise de componentes principais com spots relativos às proteínas expressas em menor quantidade nas ostras mantidas nos locais contaminados (géis em tetraplicata). BUC: local poluído; LIS:cultivo; RIB: cultivo..... 107

Figura 8 - Análise de componentes principais com os spots relativos às proteínas expressas em maior quantidade nos animais mantidos no local contaminado (géis em tetraplicata). BUC: local poluído; LIS:cultivo; RIB: cultivo..... 107

Figura 9 - Parâmetros de qualidade de água analisados em amostras obtidas no experimento de campo. SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local poluído. <LDM: abaixo do limite de detecção do método..... 109

Figura 10 - Níveis de contaminantes orgânicos encontrados nos sedimentos dos locais de exposição (ng. g^{-1} peso seco). SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local contaminado. 110

Figura 11 - Níveis de esteroides fecais no sedimento dos locais estudados (A) e relação entre os esteroides fecais (B). SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local contaminado. 111

Figura 12 - Níveis de contaminantes orgânicos em ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias nos diferentes locais de estudo. SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local poluído. <LDM: abaixo do limite de detecção do método. 112

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Níveis de LABs em tecidos de *Crassostrea gigas* expostas durante 36 horas a $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de alquilbenzenos lineares (LAB) e esgoto sanitário (ESG diluído 33%). CS: controle solvente; LAB: alquilbenzenos lineares; CT: controle; ESG: esgoto sanitário. . 144

Figura 2 - Atividade das enzimas analisadas em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*. CT: controle; ESG: esgoto sanitário 33%; CS: controle solvente; LAB: alquilbenzenos lineares $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,05$). SOD: superóxido dismutase; GR: glutathione redutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GST: glutathione S-transferase; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase.... 145

Figura 3 - Transcrição de genes em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas em diferentes tempos (12h, 24h, 36h) ao esgoto sanitário (ESG, 33%) e aos alquilbenzenos lineares (LAB, $40 \mu\text{g.L}^{-1}$). O asterisco (*) demonstra a diferença estatística entre o tempo de exposição com seu respectivo controle (ESG x CT; LAB x CS). ($p < 0,05$). O asterisco (*) demonstra a diferença estatística entre o tempo de exposição com seu respectivo controle (ESG x CT; LAB x CS). ($p < 0,05$). 147

Lista de Tabelas

CAPÍTULO II

Tabela 1- Sequência dos iniciadores utilizados e identificação do código de acesso no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). 46

Tabela 2 - Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de *Crassostrea gigas* (ng.g^{-1} peso seco) do Tempo zero (SAM) e expostas por 14 dias nas diferentes áreas de estudo (RIB, LIS, BUC). 54

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Quantidade de spots (proteínas) por gel em cada experimento realizado (poluído x cultivo). 101

Tabela 2 - Relação dos spots selecionados para sequenciamento. pI (ponto isoelétrico), Mr (peso molecular) e expressão (spots +2: ↑; spots -2x: ↓). 106

Tabela 3 - Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF de proteínas diferencialmente expressas em ostras *C. gigas* exposta ao esgoto sanitário. 108

Tabela 4 - Resultados médios da análise das amostras de água coletadas durante o experimento de exposição. 109

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de cada gene e código de acesso no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). 141

Sumário

CAPÍTULO I

<i>A zona costeira e os efeitos da densidade populacional</i>	<i>25</i>
<i>A aquicultura em ecossistemas costeiros e seus desafios frente à poluição urbana.....</i>	<i>28</i>
<i>Moluscos bivalves: organismos-sentinela marinhos.....</i>	<i>29</i>
<i>Exposição aos xenobióticos e os biomarcadores.....</i>	<i>30</i>
<i>Biomarcadores moleculares.....</i>	<i>31</i>
<i>Biomarcadores bioquímicos.....</i>	<i>32</i>
<i>Proteômica ambiental.....</i>	<i>33</i>
<i>O desafio dos biomarcadores específicos para o esgoto sanitário... </i>	<i>35</i>
<i>Estrutura e objetivos da tese</i>	<i>36</i>

CAPÍTULO II

O IMPACTO DO ESGOTO SANITÁRIO NA REGIÃO COSTEIRA URBANIZADA: INFLUÊNCIA NA TRANSCRIÇÃO DE GENES EM OSTRAS <i>Crassostrea gigas</i>	39
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Metodologia	44
Resultados	50
Discussão	58
Conclusões	69
Agradecimentos	71
Referências bibliográficas	71

CAPÍTULO III

EXPRESSÃO PROTEICA DE OSTRAS DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i> EXPOSTAS <i>IN SITU</i> A EFLUENTES COM ESGOTO SANITÁRIO, FLORIANÓPOLIS, SC	87
Resumo.....	88
Abstract	89
Introdução.....	90
Metodologia.....	93
Resultados	101
Discussão.....	113
Conclusões.....	119
Agradecimentos	120
Referências bibliográficas	120

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DOS ALQUILBENZENOS LINEARES E DO ESGOTO SANITÁRIO NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM OSTRAS DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i>	131
Resumo.....	132
Abstract	133
Introdução.....	134
Metodologia.....	138
Resultados	143
Discussão.....	148
Conclusões.....	154
Agradecimentos	155
Referências bibliográficas	156

CAPÍTULO V

Conclusões finais	169
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1	173

CAPÍTULO I – Introdução

A zona costeira e os efeitos da densidade populacional

O crescimento demográfico em regiões costeiras mundiais tem acarretado uma série de ameaças à qualidade de vida de organismos estuarinos e marinhos, pondo em risco também a saúde humana (CULLITON, 1998; HAWKINS et al., 2002; CREEL, 2003; HALPERN et al., 2008; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009; SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012).

Estima-se que cerca de 40% da população mundial (~ 2,8 bilhões de pessoas) vive a menos de 100 quilômetros da costa (LARUELLE et al., 2012). Treze das vinte megacidades mundiais (cidades com mais de 10 milhões de pessoas) se encontram ao longo da costa, com aproximadamente 700 milhões de pessoas vivendo em regiões muito próximas a área costeira, cerca de dez metros acima do nível do mar (UNESCO, 2011). Megacidades costeiras podem ser vistas como um símbolo das atuais pressões humanas nos sistemas costeiros por causa das consequências ambientais que emergem do seu desenvolvimento (SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012 – Figura 1).

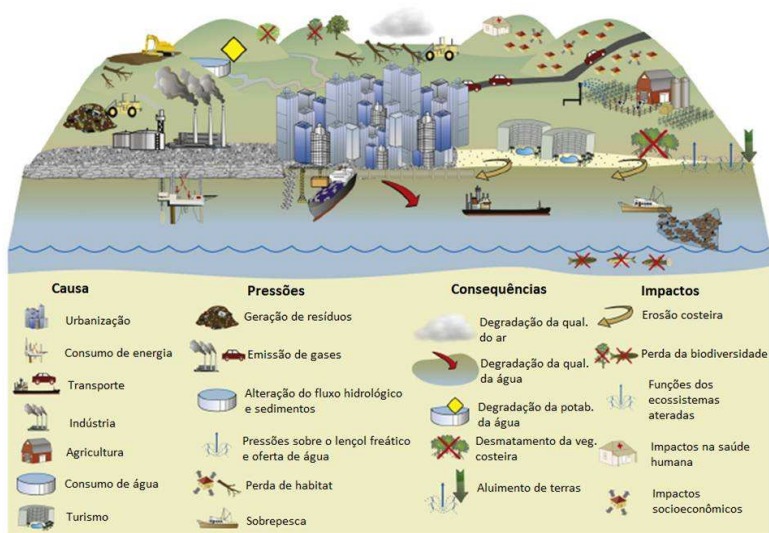


Figura 1 - Origem, pressões, situação e impactos das megacidades na zona costeira. (modificado de SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012).

Até 2015, estima-se que mais de um quinto da população mundial estará vivendo junto à costa, principalmente nos países em desenvolvimento, especialmente em áreas urbanas que não possuem infraestrutura suficiente de coleta e tratamento de esgoto (CORCORAN et al., 2010). As migrações para áreas urbanas costeiras têm taxas de crescimento superiores às taxas de crescimento da população total (SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012).

Segundo Serafim e Hazin (2006), aproximadamente 25% da população brasileira está concentrada em 400 municípios localizados na zona costeira, com uma densidade populacional de quase cinco vezes maior que a média nacional e um percentual de 89% localizada em área urbanizada. Dos dezessete estados brasileiros litorâneos, treze possuem suas capitais administrativas situadas à beira-mar (SERAFIM; HAZIN, 2006).

A poluição marinha, a partir de fontes terrestres, tais como escoamento agrícola, esgoto sem tratamento, descarga de nutrientes e pesticidas em terra tem sido um problema sério em áreas costeiras, apesar de acordos internacionais sobre causa e efeito e opções para a mitigação (UNESCO, 2011). Aproximadamente 41% dos oceanos mundiais sofrem com impactos de média a alta magnitude proveniente de atividades humanas, principalmente, em regiões densamente ocupadas e industrializadas (HALPERN et al., 2008; UNESCO, 2011).

De acordo com Halpern e colaboradores (2008), atualmente toda a costa brasileira pode ser classificada como média ou altamente impactada, e algumas regiões, como a Sudeste, apresentam níveis alarmantes de influência humana (Figura 2).

Por este cenário, a costa brasileira merece especial atenção, tendo em vista que atuais tendências de crescimento econômico, como por exemplo, àquelas associadas à expectativa de intensa exploração de novas áreas petrolíferas expondo o país a uma situação de potencial risco ambiental (LUCHMANN, 2012). Ainda que o crescimento observado nos últimos anos seja inquestionável, o Brasil continua sendo um país em desenvolvimento, cujas necessidades essenciais, como saneamento básico, por exemplo, estão muito aquém da demanda hoje existente (BAER, 2008).

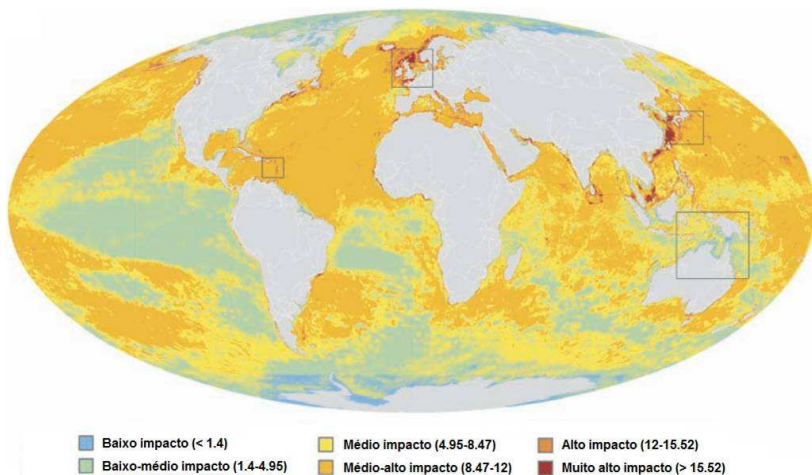


Figura 2 - Mapa global do impacto antrópico em 20 tipos de ecossistemas costeiros e oceânicos. Em destaque as regiões fortemente impactadas no Caribe, no Mar do Norte, e em águas japonesas, e uma das menos impactadas (no quadrado à direita) na Austrália. Os números referem-se à escala de impacto acumulado definida pelos autores, variando do menos impactado (azul) ao mais impactado (vermelho). (modificado de HALPERN et al., 2008).

Segundo a última edição do *Atlas de Saneamento 2011*, aproximadamente 45% dos municípios brasileiros não possuem rede de coleta de esgoto. O impacto do esgoto sanitário na costa brasileira fica claro quando se observa a localização das cidades sem esgotamento sanitário concentradas principalmente no litoral das regiões Sul e Nordeste do Brasil (Figura 3) (IBGE, 2011).

A plataforma continental é a região mais produtiva dos oceanos e de onde são retiradas cerca de 90% da produção mundial de pescados (PAULY et al., 2005). No entanto, a contaminação de águas costeiras representa um risco potencial para várias atividades marinhas, entre elas a aquicultura (BAYEN; LEE; OBBARD, 2007). Apesar das regiões estuarinas estarem entre as áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade, estão entre as regiões mais afetadas no mundo pelo descarte constante de efluentes oriundos de atividades antropogênicas (RIDGWAY; SHIMMIELD, 2002).

O impacto do esgoto sanitário é uma das principais fontes de contaminação nos ecossistemas marinhos e estuarinos, promovendo efeitos adversos em tecidos alvo e organismos expostos como um todo,

podendo refletir alterações em diferentes níveis biológicos e ecológicos (KENNISH, 1992; ABESSA et al., 2005; MARTINS et al., 2008).

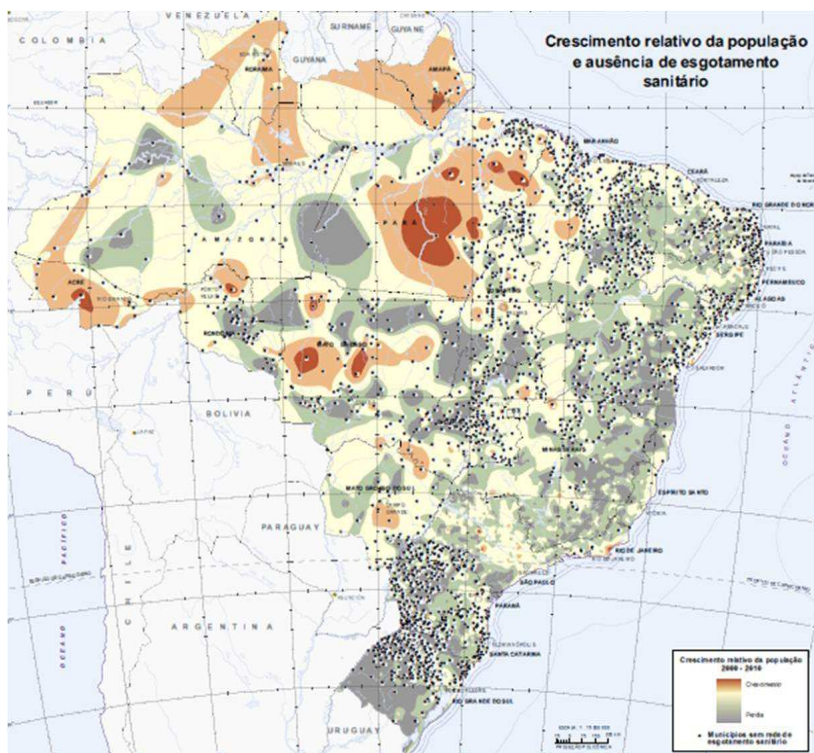


Figura 3 - Mapa do crescimento relativo da população e ausência de esgotamento sanitário. Os pontos pretos no mapa representam os municípios sem rede de esgotamento sanitário. As regiões Sul e Nordeste se destacam em relação às cidades litorâneas. (Fonte: IBGE, 2011).

A aquicultura em ecossistemas costeiros e seus desafios frente à poluição urbana

Em função da crescente demanda por alimento de boa qualidade nutricional, atividades relacionadas à maricultura, tais como, ostreicultura, mitilicultura e piscicultura têm sido ameaçadas em função do comprometimento da qualidade da água decorrente do lançamento de contaminantes antrópicos nas zonas costeiras (BAYEN; LEE;

OBBARD, 2007; FAO, 2007; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009).

A produção aquícola cresceu mais de 60% nos últimos anos e, atualmente, fornece cerca de 50% de todo o pescado comercializado no mundo (FAO, 2011). No entanto, o esgoto sanitário gerado pelos centros urbanos e industriais localizados no entorno de baías e enseadas estão entre as principais fontes de introdução de contaminantes nesses ambientes, afetando a qualidade de vida dos organismos que ali vivem (KENNISH, 1992; WALKER et al., 2001, ZANETTE et al., 2008).

A variedade e concentração de substâncias presentes no esgoto sanitário são complexas e de difícil caracterização (ABESSA et al., 2005). O esgoto sanitário é composto por abundante matéria orgânica, produtos de higiene pessoal, medicamentos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alifáticos (HA), pesticidas, bifenilos policlorados (BPCs) detergentes alquilbenzenos lineares (LABs), entre outros compostos (ABESSA et al., 2005; GAGNÉ et al., 2007).

Novas substâncias potencialmente poluidoras, chamadas de contaminantes emergentes, estão presentes no esgoto sanitário e são oriundas de atividades domésticas comuns (higiene pessoal, produtos de limpeza, lavagem de roupas), descarte inadequado de medicamentos e outros resíduos humanos (USEPA, 2009). Detergentes, fármacos, produtos de uso pessoal e desreguladores endócrinos (hormônios naturais e sintéticos) vêm recebendo atenção quanto aos efeitos sobre a biota, bem como sua regulamentação para o descarte no ambiente aquático (BOLONG et al., 2009; USEPA, 2009). Neste sentido, a avaliação dos efeitos tóxicos em organismos expostos ao esgoto constitui um dos maiores desafios para a ecotoxicologia aquática atual.

Moluscos bivalves: organismos-sentinela marinhos

Estudos visando avaliar os níveis de contaminantes em ecossistemas aquáticos e seus efeitos sobre a biota têm utilizado moluscos bivalves (ostras e mexilhões) como organismos-sentinela. Estes animais são organismos-alvo por apresentarem características como ampla distribuição geográfica, espécies filtradoras e sésseis, portanto, indicadores da região de estudo com grande capacidade de acumulação de contaminantes biodisponibilizados na coluna na água (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; BEEBY, 2001; CHEUNG et al., 2002; CHEUNG et al., 2001; LAU; WONG, 2003).

Entre os moluscos bivalves, destaca-se a espécie *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1789) por ser a principal espécie de bivalve marinho cultivada e consumida no mundo, uma das mais estudadas e vem sendo utilizada como organismo sentinela em estudos de avaliação ambiental (HUNTER et al., 1995; CAPUZZO, 1996; GUNTHER et al., 1999; MAO et al., 2006; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; ZANETTE et al., 2008).

Estudos de avaliação da contaminação ambiental têm incorporado a análise de biomarcadores nos animais expostos na tentativa de quantificar os efeitos tóxicos e riscos de exposição aos xenobióticos presentes no ambiente (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; RODRIGUEZ-ORTEGA et al., 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ALLEN; MOORE, 2004; MOORE et al., 2004; FOWLER, 2005; ZANETTE et al., 2008). Dependendo dos contaminantes a serem estudados, diferentes grupos de biomarcadores específicos nos organismos expostos podem ser selecionados para serem avaliados (BEYER et al., 2013). Desta forma, devido à composição altamente variável do esgoto sanitário, a busca por biomarcadores responsivos com maior especificidade torna-se necessária.

Recentes pesquisas utilizando biomarcadores demonstram o impacto do esgoto sanitário em organismos aquáticos marinhos (MEDEIROS et al., 2008a; ZANETTE et al., 2008; COMOGLIO et al., 2011; ANDREW-PRIESTLEY et al., 2012; MARIGÓMEZ et al., 2013).

Exposição aos xenobióticos e os biomarcadores

Xenobióticos podem causar alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico, resultando em um efeito negativo não apenas nas comunidades animais e vegetais naturais, como nos organismos cultivados e destinados para o consumo humano (MOORE et al., 2004).

Essas alterações biológicas que expressam os efeitos tóxicos causados pelos poluentes em organismos aquáticos são chamadas de biomarcadores (HUGGETT et al., 1992). Dentre esses, os biomarcadores bioquímicos e moleculares podem servir como sinal de alerta precoce de degradação ambiental causada por contaminantes, podendo assim antecipar possíveis danos em níveis superiores de organização biológica, como alterações sobre populações e

comunidades biológicas, possibilitando a detecção de riscos a tempo de tomar medidas corretivas e reverter uma situação adversa (RAND, 1995; CAJARAVILLE et al., 2000; WALKER et al., 2001).

Os biomarcadores podem indicar tanto a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000). Dentre os biomarcadores de exposição, estão as enzimas de biotransformação de xenobióticos, as metalotioneínas e as defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), sendo que dentre os biomarcadores de efeito estão os níveis de dano no DNA e de oxidação de lipídios e proteínas (CAJARAVILLE et al., 2000; RAND, 1995).

Muitos contaminantes orgânicos são lipofílicos, o que faz com que sejam rapidamente absorvidos pelos organismos aquáticos, através das membranas lipídicas dos tecidos expostos. Após a absorção, a ação destes compostos vai depender de sua susceptibilidade à biotransformação.

Em geral, as primeiras respostas biológicas dos animais expostos ocorrem em nível de aumento ou diminuição na transcrição gênica (BRULLE et al., 2008). Os contaminantes atuam como efetores de receptores celulares, que, por sua vez, interagem com sequências específicas de DNA promovendo a transcrição de múltiplos genes que irão ser traduzidos em proteínas/enzimas (PIÑA; CASADO; QUIROS, 2007). A compreensão dessas respostas pode auxiliar na elucidação dos efeitos dos contaminantes em diferentes vias metabólicas e em diferentes espécies expostas, evidenciando vias de adaptação e resistência ou de susceptibilidade e morte (JU et al., 2006; BRULLE et al., 2008).

Biomarcadores moleculares

Como citado anteriormente, os xenobióticos ativam receptores celulares, que, por sua vez, interagem com sequências específicas de DNA, promovendo a transcrição de genes. O produto da transcrição é o RNA mensageiro (RNAm), que é processado e enviado ao citoplasma para que o ribossomo sintetize a proteína/enzima correspondente, constituindo a base molecular da resposta biológica à presença do efector (PIÑA; CASADO; QUIROS, 2007). Desta forma, a regulação da transcrição de genes representa o primeiro nível de interação entre um

agente estressor e o genoma, em resposta a doenças e estímulos ambientais (JU et al., 2006; BRULLE et al., 2008).

Diferentes técnicas moleculares, sequenciamento de última geração e hibridização subtrativa supressiva estão sendo aplicadas para identificar genes com potencial para utilização como biomarcadores de contaminação ambiental em ostras *C. gigas* (BULTELLE et al., 2002; MEDEIROS et al., 2008a; FLEURY et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Essas técnicas permitem avaliar os níveis de transcrição de múltiplos genes, proporcionando a obtenção de um perfil global das respostas transcriptômicas dos organismos expostos (BULTELLE et al., 2002). Além disso, técnicas de PCR em tempo real (qRT-PCR) são utilizadas para quantificar os níveis de transcrição de genes de interesse para serem utilizados no monitoramento ambiental.

Ostras podem se adaptar aos produtos químicos presentes no esgoto sanitário fazendo uso de diferentes estratégias para sobreviver em áreas poluídas. A transcrição de genes relacionados com diferentes funções metabólicas, como biotransformação, transporte de membrana, metabolismo aeróbico e maquinaria de tradução podem ser transcritos a fim de manter a homeostase celular. Desta forma, a aplicabilidade potencial da análise da transcrição diferencial de genes que possuem papéis importantes no metabolismo e biotransformação podem servir como sinal precoce de alerta para o monitoramento da qualidade da água utilizando bivalves como organismos sentinela (MEDEIROS et al., 2008b). Sendo assim, genes que codificam proteínas, como as enzimas potencialmente responsivas ao estresse oxidativo e biotransformação (ex. *SOD-like*, *CAT-like*, *G6PDH-like*, *GST-like*, *HSP-like*; *CYP450-like*) devem ser consideradas em estudos de toxicidade de poluentes emergentes como biomarcadores de efeito.

Biomarcadores bioquímicos

As defesas antioxidantes estão presentes em todos os organismos aeróbicos, uma vez que intermediários reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidos no processo de fosforilação oxidativa para obtenção de energia, ação fagocitária de leucócitos, atividade de enzimas, entre outras (DI GIULIO et al., 1989; STOREY, 1996).

Entretanto, em ambientes poluídos pode ocorrer o aumento na produção de EROs, e, nesse caso, os organismos necessitam aumentar

suas defesas antioxidantes a fim de evitar os efeitos nocivos causados por estas espécies químicas. A exposição a EROs é conhecida por causar uma série de modificações e inativação de proteínas, danos de DNA e morte celular (REGOLI et al., 2002; GHEZZI; BONETTO, 2003; MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005).

Para proteger contra os efeitos deletérios das EROs, as células contêm uma rede complexa de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante clássico envolve enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é degradado pela CAT e GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Enzimas auxiliares, tais como a glutathione reductase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), reciclam GSH e NADPH, respectivamente, contribuindo para a manutenção de um ambiente redox intracelular necessário para a manutenção da homeostase (CIRCU; AW, 2010). O desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes nas células promove processos mutagênicos, carcinogênicos e morte celular (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992; REGOLI et al., 2002).

As enzimas envolvidas na eliminação dos subprodutos de EROs desempenham um papel importante como antioxidantes indiretos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004), tais como as glutathione-S-transferases (GSTs). As GSTs são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de uma ampla gama de substratos eletrofílicos, geralmente produzidos durante a fase-I da biotransformação de compostos orgânicos, com o tripeptídeo glutathione GSH (STOREY, 1996).

Proteômica ambiental

Embora a informação armazenada no nível do DNA possa ser usada para prever os processos biológicos, as proteínas são os executores finais dos vários programas de resposta celular (RUDERT; GE; ILAG, 2000). A identificação de proteínas que são induzidas ou reprimidas nos permite tirar conclusões sobre os mecanismos

moleculares de resposta ao agente estressor (NESATYY; SUTER, 2007).

O princípio central da proteômica ambiental é que a expressão global das proteínas é específica para as condições vividas pelos organismos (BRADLEY et al., 2002). Investigações com base em ferramentas proteômicas têm sido úteis na determinação qualitativa e quantitativa das proteínas, bem como na identificação de proteínas-chave envolvidas nas respostas fisiológicas de microrganismos, quando expostos a poluentes antropogênicos (DESAI; PATHAK; MADAMWAR, 2010).

Proteômica é definida como o estudo das proteínas expressas por um genoma ou tecido, podendo refletir nessa expressão as adaptações ambientais induzidas por poluentes e processos patológicos (MOORE, 2002; LÓPEZ, 2005). Estudos com essa técnica pode fornecer informações úteis para o desenvolvimento de novas ferramentas de biomonitoramento com maior relação com diferentes tipos de contaminantes ambientais (THOMPSON et al., 2012).

Nesse sentido, análises proteômicas vêm sendo utilizadas como ferramenta de toxicologia ambiental tendo o conceito empregado em estudos com bivalves, sendo complementar aos estudos genômicos (PANDEY; MANN, 2000; LÓPEZ, 2005; JONSSON et al., 2006). Avanços na separação de proteínas, ionização de peptídeos e metodologias de identificação têm elevado o uso da proteômica para uma gama diversificada de organismos-sentinela (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012).

Devido às características sésseis dos bivalves, a proteômica pode proporcionar uma melhor correlação entre o estresse analisado e a toxicidade dos poluentes (CAMPOS et al., 2012). Nesse sentido, a utilização de proteínas como biomarcadores vem sendo aplicada para moluscos de cultivo (LÓPEZ et al., 2002) e para avaliar diferentes impactos ambientais, como algas tóxicas (RONZITTI et al., 2008), infecções por protozoários (CAO et al., 2009), contaminantes orgânicos (OLSSON et al., 2004; JONSSON et al., 2006; MONSINJON et al., 2006; APRAIZ; CAJARAVILLE; CRISTOBAL, 2009), efluentes urbanos (AMELINA et al., 2007), metais-traço (SHEPARD; BRADLEY, 2000; CHORA et al., 2008; CHORA et al., 2009; LIU; WANG, 2012; THOMPSON et al., 2012a) e nanopartículas (GOMES et al., 2013).

Proteínas relacionadas com metabolismo energético, citoesqueleto, estabilização proteica e *turnover*, estresse oxidativo e

sinalização são respostas comuns às alterações ambientais (TOMANEK, 2011).

Entre as metodologias utilizadas, a eletroforese bidimensional em géis de acrilamida (*two-dimensional gel electrophoresis* – 2DE) é a ferramenta mais estabelecida e utilizada (LEMONS et al., 2010). A comparação das proteínas expressas em maior ou menor quantidade nesses géis, em simultâneo, são chamadas de “mapas proteômicos” ou perfis de expressão proteica (PEPs – *Protein Expression Profiles*).

Os PEPs podem ser utilizados como uma tela de expressão-padrão, porém não estão diretamente relacionados com um único agente estressor. A comparação entre PEPs (e. g. tratado x controle) fornece um padrão de resposta, chamado de assinatura de expressão proteica ou PESs (*Protein Expression Signatures*).

As PESs são grupos de proteínas específicas expressas diferencialmente, refletindo uma resposta frente a algum desafio (BRADLEY et al., 2002). As PESs possibilitam a seleção de proteínas diretamente relacionadas com o agente estressor, possíveis interações proteína-proteína (RUDERT; GE; ILAG, 2000), sendo utilizadas como ferramenta em programas de monitoramento ambiental (SHEPARD et al., 2000; APRAIZ; CAJARAVILLE; CRISTOBAL, 2009).

O desafio dos biomarcadores específicos para o esgoto sanitário

A complexidade de estimar o impacto do esgoto sanitário em áreas costeiras urbanizadas está diretamente relacionada com a variabilidade de sua composição e volume, bem como com as características precursoras sob os aspectos socioeconômicos, nível de desenvolvimento e localização geográfica da região impactada.

Nesse contexto, programas de biomonitoramento ambiental são propostos com o intuito de alertar e prevenir danos nos ecossistemas costeiros, recomendando: 1) o uso de organismos bioindicadores de contaminação; 2) a realização de análises químicas, que determinam analiticamente a concentração dos contaminantes; 3) e a investigação de parâmetros biológicos, como a utilização de biomarcadores de contaminação aquática, que reflitam os impactos dos xenobióticos nos organismos expostos (LUCHMANN, 2012).

Dada a importância da região costeira para a produção de pescados destinados ao consumo humano, o crescente volume demográfico nessas regiões e o aumento da população mundial em nível

global nos próximos anos, o desafio da ecotoxicologia mundial está em encontrar ferramentas que forneçam informações robustas sobre os reais prejuízos ambientais, econômicos e sociais oriundos da contaminação da zona costeira por efluentes urbanos.

Técnicas transcriptômicas e proteômicas oferecem ferramentas para avaliar problemas complexos, tendo um considerável potencial para o uso na avaliação de risco ecológico (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; KLING et al., 2008). Por serem abordagens complementares, a combinação dessas ferramentas facilita uma visão global dos desafios ambientais (POYNTON; WINTZ; VULPE, 2008; CAO et al., 2009).

Esses métodos possibilitam avaliar os mecanismos de toxicidade induzida quimicamente e identificar padrões de resposta, possivelmente refletindo potenciais biomarcadores específicos. A grande quantidade de dados que podem ser gerados utilizando essas técnicas permite avaliar o efeito da interação de xenobióticos nos locais de estudo, bem como os potenciais efeitos adversos inesperados (KLING et al., 2008). Uma das grandes dificuldades em ecotoxicologia é associar os efeitos nocivos de poluentes químicos com as consequências ecológicas (MOORE, 2002).

Estrutura e objetivos da tese

Observada a necessidade de fornecimento crescente de pescados de qualidade e garantia de origem frente à demanda mundial por alimentos cada vez mais seguros, torna-se evidente a urgência de estudos que vislumbrem a lacuna existente frente a um dos principais impactos do crescimento demográfico: a contaminação costeira por esgoto sanitário.

Nesse sentido, o objetivo desta tese foi avaliar diferentes respostas celulares da ostra *C. gigas* frente ao desafio de exposição ao esgoto sanitário, a fim de validar e identificar potenciais novos biomarcadores. Para tanto, buscou-se a utilização de biomarcadores moleculares, preteritamente identificados para a ostra *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário, na avaliação e aplicabilidade no monitoramento da área costeira urbanizada. Vale ressaltar que os dados gerados por esta tese podem se tornar importantes fontes de informação para a pesquisa dos efeitos do esgoto sanitário em áreas costeiras urbanizadas.

Os capítulos desta tese foram separados de acordo com o delineamento experimental, métodos e parâmetros, com o intuito de atingir os objetivos propostos. Com exceção do Capítulo 1, que

representa esta introdução, e o Capítulo 5, que apresenta as principais considerações e conclusões finais desta tese, cada capítulo representa um manuscrito preparado para ser submetido para publicação subsequentemente à defesa.

Vale destacar que os resultados parciais do delineamento experimental que deram origem aos Capítulos 2 e 3 desta tese (experimento de campo) já foram publicados (análises bioquímicas - SOUZA et al., 2012). O Capítulo 4 compreende um delineamento experimental sob condições controladas de laboratório, a fim de verificar uma possível relação entre as respostas observadas no Capítulo 2 e os contaminantes bioacumulados em *C. gigas*. Como os capítulos foram trabalhados em colaboração com outros grupos, os pesquisadores participantes na geração dos dados são apresentados como coautores.

O Capítulo 2 aborda uma avaliação de uma seleção de genes relacionados com o sistema antioxidante, transporte e armazenamento, metabolização de xenobióticos e estresse celular. Ostras *C. gigas* foram mantidas *in situ* em mini-balsas por 24 horas em ambiente sob influência do esgoto sanitário. Os níveis dos genes transcritos em duas áreas de cultivo foram comparados com os níveis de transcrição encontrados nas ostras mantidas no local sob a influência do esgoto sanitário. Os resultados deste estudo permitiram validar em campo genes identificados como possíveis biomarcadores moleculares de contaminação por esgoto sanitário.

O Capítulo 3 apresenta as alterações pós-transcricionais em glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas em local contaminado por esgoto sanitário. Até o presente momento, sabe-se que este é o primeiro estudo sobre alterações proteômicas em resposta ao esgoto sanitário em organismos marinhos. Das trinta proteínas diferencialmente expressas neste estudo, cinco delas apresentaram homologia com proteínas identificadas e disponíveis em bancos de dados. Os resultados sugerem que as alterações oriundas da exposição ao esgoto sanitário podem promover apoptose e interferências no sistema imune das ostras. As proteínas identificadas estão relacionadas com o citoesqueleto e a estrutura celular, ubiquitinação, ciclo celular e transdução de sinal. As análises proteômicas foram realizadas durante o doutoramento sanduíche (PDEE-CAPES) realizado na Universidade do Algarve entre Ago/2010 e Ago/2011, sob orientação da Profa. Dra. Maria João Bebianno.

O Capítulo 4 compreende os resultados de um experimento realizado em condições controladas de laboratório. O objetivo foi

verificar uma possível relação entre a transcrição diferencial observada dos genes do experimento *in situ* (Cap. 2) com a bioacumulação de LABs observada nas ostras expostas no local contaminado. O delineamento foi realizado de forma a verificar a transcrição diferencial ao longo de 36 horas de exposição, com análise em três diferentes tempos (12h, 24h e 36h). Biomarcadores enzimáticos e de conjugação também foram utilizados.

Finalmente, o Capítulo 5 sumariza as principais conclusões obtidas nos Capítulos 2, 3 e 4, bem como destaca as considerações finais sobre os dados obtidos ao final dos cinco anos deste estudo.

O volume de informações contidas nesta tese fornece material original para a produção de pelo menos três manuscritos. Os Capítulos 2 e 3 estão sendo preparados para submissão em periódicos da área, como MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH e ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY. Os resultados do Capítulo 4 desta tese possivelmente serão preparados à submissão para o periódico AQUATIC TOXICOLOGY. Conforme citado anteriormente, parte dos resultados gerados nestes cinco anos de estudos já foram publicados e encontram-se disponíveis para consulta (SOUZA et al., 2012 - Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 153-161).

CAPÍTULO II

O IMPACTO DO ESGOTO SANITÁRIO NA REGIÃO COSTEIRA URBANIZADA: INFLUÊNCIA NA TRANSCRIÇÃO DE GENES EM OSTRAS *Crassostrea gigas*

Fabício Flores-Nunes¹; Jacó J. Mattos²; Flávia L. Zacchi¹; Guilherme Toledo-Silva³; Juliano Zanette⁴; Silvio Sasaki⁵; Márcia Bicego⁵; Satie Taniguchi⁵; Célia R. M. Barardi⁶; Cláudio M. R. Melo⁷; Afonso C. D. Bainy¹;

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

² Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

³ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

⁴ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

⁵ Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁶ Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

⁷ Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

*Este capítulo está sendo preparado para publicação no periódico Marine Environmental Research (Estrato A2 – Zootecnia/Recursos Pesqueiros).

Resumo

O crescimento demográfico em regiões costeiras mundiais tem ameaçado a qualidade de vida de organismos estuarinos e marinhos. As atividades relacionadas à maricultura tais como, ostreicultura, mitilicultura e piscicultura têm sido ameaçadas em função do comprometimento da qualidade da água decorrente do lançamento de contaminantes antrópicos nas zonas costeiras. Neste trabalho, ostras *Crassostrea gigas* foram transplantadas para duas áreas de cultivo (RIB, LIS) e uma área poluída (BUC) a fim de avaliar os níveis de transcritos de genes selecionados a partir de uma biblioteca subtrativa de ostras expostas ao esgoto sanitário. Iniciadores foram desenhados para os genes *Tubulina β* e *GAPDH* (normalizadores), *CYP356A1*, *HSP70*, *FABP*, *GST- Ω* , *GST- Π* , *SOD*, *CAT* e *G6PDH*. Amostras de água, sedimento e ostras expostas por 14 dias foram coletadas para avaliar os locais de estudo. A estatística foi realizada utilizando o local poluído como controle positivo (BUC), sendo comparado com as áreas de cultivo (BUCxLIS; BUCxRIB). Os resultados de contaminantes demonstram o aporte antrópico em BUC confirmando a poluição. CF, DTG, O/G e MO na água; Σ HPA, Σ HA, Σ LAB e esteróis fecais no sedimento; e Σ HA, Σ HPA e Σ LAB bioacumulado nas ostras deste local comprovam a presença de esgoto sanitário na região. Foram observados em glândula digestiva maiores transcrições em BUC para *GST- Ω* (7 vezes) e de *HSP70* (2 vezes); e uma menor transcrição do gene *GST- Π* (2,5 vezes). Em brânquias destes animais, foram observadas maiores transcrições dos genes *FABP* (até 9 vezes), *GST- Ω* (até 22 vezes); e menor transcrição para *CAT* e *HSP70*. Ostras *Crassostrea gigas* expostas em ambiente contaminado com esgoto sanitário acumularam principalmente HPAs (11 a 81 vezes) e LABs (22 a 42 vezes). No presente estudo os genes *FABP* e *GST- Ω* , principalmente utilizando brânquias nas análises de PCR em tempo real, mostraram-se como potenciais candidatos a biomarcadores moleculares em ostras expostas a esgoto sanitário em áreas costeiras urbanizadas.

Palavras-chave: Região costeira urbanizada, Esgoto sanitário, *Crassostrea gigas*, *FABP*, *GST- Ω* .

THE IMPACT OF SANITARY SEWAGE ON URBAN COASTAL AREA: THE INFLUENCE ON TRANSCRIPTION OF GENES IN OYSTERS *Crassostrea gigas*

Abstract

The global demographic growth in coastal areas has threatened the quality of life of estuarine and marine organisms. Mariculture activities (oysters, mussels and fish farms) have been threatened due to the decrease of water quality resulting from the release of anthropic contaminants in coastal zones. In this study, Pacific oysters *Crassostrea gigas* were transferred to two cultivation areas (RIB, LIS) and to one polluted area (BUC) in order to evaluate the transcription levels of selected genes from a subtractive library of oysters exposed to sanitary sewage. Primers were designed for *GAPDH* and β -*tubulin* (housekeeping) and *CYP356A1*, *HSP70*, *FABP*, *GST- Ω* , *GST- Π* , *SOD*, *CAT* and *G6PDH*. Samples of water, sediment and oysters exposed during 14 days in the study sites were collected to evaluate the degree of environmental contamination. Statistical analysis was performed using the polluted site as positive control (BUC), and compared with the mollusks farming areas (BUCxLIS; BUCxRIB). The results have showed the input anthropic pollutants in BUC. FC, DTG, O/G and OM in water; Σ PAH, Σ AH, Σ LAB and fecal sterols in the sediment; Σ PAH, Σ AH and Σ LAB bioaccumulated in oysters demonstrated the presence of sanitary sewage in BUC. It was found in the digestive gland higher transcriptions from BUC oysters for *GST- Ω* (7 fold) and *HSP70* (2 fold) and a reduced gene transcription to *GST- Π* (2.5-fold). In oysters gills, higher transcripts were observed for *FABP* gene (9 fold) and *GST- Ω* (22 fold), and less *CAT* and *HSP70* gene transcription in this tissue. *Crassostrea gigas* exposed in an environment contaminated by sanitary sewage have accumulated greatly PAHs (11-81 times) and LABs (22-42 times). In the present study *FABP* and *GST- Ω* genes, particularly in the gills of real time PCR analysis, were demonstrated as potential candidates to molecular biomarkers in oysters exposed to sanitary sewage in urban coastal areas.

Keywords: Urban coastal area, sanitary sewage, *Crassostrea gigas*, *FABP*, *GST- Ω* .

Introdução

O crescimento demográfico em regiões costeiras mundiais tem acarretado uma série de ameaças à qualidade de vida de organismos estuarinos e marinhos, pondo em risco também a saúde humana (CULLITON, 1998; HAWKINS et al. 2002; CREEL, 2003; HALPERN et al. 2008; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009; SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012). Apesar de as regiões estuarinas estarem entre as áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade, estão entre as regiões mais afetadas no mundo pelo descarte constante de efluentes oriundos de atividades antropogênicas (RIDGWAY; SHIMMIELD, 2002). Em função da crescente demanda por alimento de boa qualidade nutricional, atividades relacionadas à maricultura, tais como, ostreicultura, mitilicultura e piscicultura, têm sido ameaçadas em função do comprometimento da qualidade da água decorrente do lançamento de contaminantes antrópicos nas zonas costeiras (BAYEN; LEE; OBBARD, 2007; FAO, 2007; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009).

A produção aquícola cresceu mais de 60% nos últimos anos e, atualmente, fornece cerca de 50% de todo o peixe comercializado no mundo (FAO, 2011). No entanto, o esgoto sanitário gerado pelos centros urbanos e industriais localizados no entorno de baías e enseadas estão entre as principais fontes de introdução de contaminantes nesses ambientes, afetando a qualidade de vida dos organismos que ali vivem (KENNISH, 1992; WALKER et al., 2001, ZANETTE et al., 2008).

A variedade e concentração de substâncias presentes no esgoto sanitário são complexas e de difícil caracterização (ABESSA et al., 2005). O esgoto sanitário é composto por abundante matéria orgânica, produtos de higiene pessoal, medicamentos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alifáticos (HAs), pesticidas, detergentes alquilbenzenos lineares (LABs), entre outros compostos (ABESSA et al., 2005; GAGNÉ et al., 2007).

Estudos visando avaliar os níveis de contaminantes em ecossistemas aquáticos e seus efeitos sobre a biota têm utilizado moluscos bivalves (ostras e mexilhões) como organismos-sentinela, por apresentarem uma ampla distribuição geográfica e por serem filtradores e sésseis, portanto, indicadores da região de estudo, e em muitos casos, espécies dominantes em seu habitat natural (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; BEEBY, 2001). Entre os moluscos bivalves, destaca-se a espécie *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1789)

por ser a principal espécie de ostra cultivada no mundo, uma das mais estudadas e, por isso, tem sido utilizada como organismo sentinela em programas de biomonitoramento ambiental (HUNTER et al., 1995; CAPUZZO, 1996; GUNTHER et al., 1999; MAO et al., 2006; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; ZANETTE et al., 2008).

Estudos de avaliação da contaminação ambiental têm incorporado a análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares nos animais expostos na tentativa de quantificar os efeitos tóxicos e riscos de exposição aos contaminantes presentes no ambiente (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; RODRIGUEZ-ORTEGA et al., 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ALLEN; MOORE, 2004; MOORE et al., 2004; FOWLER, 2005). Dependendo dos contaminantes a serem estudados, diferentes grupos de biomarcadores específicos nos organismos expostos podem ser selecionados para serem avaliados (BEYER et al., 2013). Devido à composição altamente variável do esgoto sanitário, a busca por biomarcadores responsivos que sejam relativamente específicos torna-se necessária, por isso algumas ferramentas vêm sendo testadas.

A avaliação de biomarcadores bioquímicos e moleculares pode servir como sinal de alerta precoce de degradação ambiental causada por contaminantes, antecipando, assim, possíveis danos em níveis superiores de organização biológica, como alterações sobre populações e comunidades biológicas, possibilitando a detecção de riscos a tempo de tomar medidas corretivas e reverter uma situação adversa (RAND, 1995; CAJARAVILLE et al., 2000; WALKER et al., 2001).

Em geral, as primeiras respostas biológicas dos animais expostos ocorrem em nível de aumento ou diminuição na transcrição gênica (BRULLE et al., 2008). Os contaminantes atuam como efetores de ativação de receptores celulares, que, por sua vez, interagem com sequências específicas de DNA promovendo a transcrição de múltiplos genes que irão ser traduzidos em proteínas (PIÑA; CASADO; QUIRÓS, 2007). A compreensão dessas respostas pode auxiliar na elucidação dos efeitos dos contaminantes em diferentes vias metabólicas e em diferentes espécies expostas, evidenciando vias de adaptação e resistência ou de susceptibilidade e morte (JU et al., 2006; BRULLE et al., 2008).

Diferentes técnicas moleculares, sequenciamento de última geração e hibridização subtrativa supressiva estão sendo aplicadas para identificar genes com potencial para utilização como biomarcadores de contaminação ambiental em ostras *C. gigas* (BULTELE et al., 2002;

MEDEIROS et al, 2008a; FLEURY et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Estas técnicas permitem avaliar os níveis de transcrição de múltiplos genes, proporcionando a obtenção de um perfil global das respostas transcriptômicas dos organismos expostos (BULTELLE et al., 2002). Além disso, técnicas de PCR em tempo real (qRT-PCR) são utilizadas para quantificar os níveis de transcrição de genes de interesse para serem utilizados no monitoramento ambiental.

O objetivo deste estudo foi validar potenciais biomarcadores moleculares avaliando os níveis de transcrição de genes selecionados a partir de uma biblioteca subtrativa de ostras *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário, em animais mantidos em áreas destinadas ao cultivo de moluscos e em áreas contaminadas por esgoto sanitário na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil.

Metodologia

Delineamento experimental

As ostras *Crassostrea gigas* (6-8 cm), de mesmo lote e condições de cultivo, foram coletadas (n=200) na área de cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na Praia de Sambaqui, Florianópolis, SC (Local 1: SAM). As ostras foram selecionadas por tamanho, limpas de bioincrustações e retornaram ao mar para minimização do estresse de selação e limpeza. Após sete dias, os animais foram separados em três grupos (n = 50) e transplantados para duas áreas de cultivo: Santo Antônio de Lisboa (Local 2: LIS – Baía norte) e Ribeirão da Ilha (local 3: RIB – Baía sul). Estes dois locais são regiões de grande concentração de cultivos, portanto representativos na produção aquícola. Um local contaminado, localizado na foz do rio Bücheler, que recebe uma grande quantidade de esgoto sanitário foi utilizado como controle positivo (local 4: BUC) (Figura 1). Durante o experimento as ostras foram mantidas em mini-balsas experimentais (Figura 2).

Após 24h de exposição, dez ostras foram coletadas em cada local, dissecadas e as brânquias e glândula digestiva de cada animal foi imediatamente preservada em reagente de preservação de RNA (RNA Later) para análises moleculares posteriores. Para avaliar a bioacumulação dos contaminantes, um grupo de dez ostras foi mantido por duas semanas (14d) em cada local de estudo. Amostras de sedimento (250 g) foram coletadas com o uso de uma draga Petit Ponar

modificada em todos os locais para a realização de análises de contaminantes orgânicos. Todas as etapas realizadas nos diferentes locais (exposição e amostragem) foram realizadas simultaneamente.

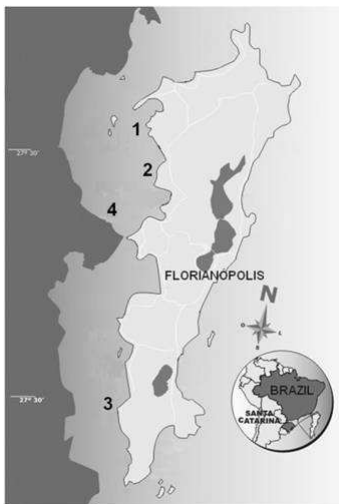


Figura 1 - Locais de estudo utilizados para o transplante das ostras na região das baías da Grande Florianópolis. 1- Praia do Sambaqui; 2- Praia de Santo Antônio de Lisboa; 3- Foz do Rio Bücheler; 4- Praia do Ribeirão da Ilha.



Figura 2 - Mini-balsa utilizada para a manutenção das ostras durante a exposição in situ nos diferentes locais.

Preparação das amostras para análises moleculares

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies). A

concentração e pureza do RNA foi confirmada por espectrofotometria (NanoDrop, software ND1000 - Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando a absorbância a 260 nm e a relação de 260/280nm, respectivamente. A transcrição reversa para síntese de cDNA a partir de 1 ug de RNA total foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Análises de PCR em tempo real (qRT-PCR)

Os iniciadores foram desenhados com base em sequências de genes depositados para a espécie no GenBank® (www.ncbi.nlm.nih.gov) e de hibridações supressivas subtrativas realizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Afonso C. D. Bainy para a espécie estudada. Os iniciadores utilizados foram desenhados através do programa Primer3/PrimerQuest da Integrated DNA Technologies (IDT) (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index) para os genes da *Tubulina β* (normalizador), *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH* (normalizador), *Citocromo P450 família 356A1 (CYP356A1)*, *Proteína de choque térmico 70 (HSP70)*, *Proteína ligante de ácidos graxos (FABP)*, *Glutathione S-transferase classe ômega (GST- Ω)*, *Glutathione S-transferase classe pi (GST-II)*, *Superóxido dismutase (SOD)*, *Catalase (CAT)* e *Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)* (Tabela 1).

Tabela 1- Sequência dos iniciadores utilizados e identificação do código de acesso no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Gene	Acesso GenBank	Sequencia dos iniciadores	
		Foward	Reverse
<i>Tubulina β</i>	AB196534	CCAGCAGATGTTTCGACGCCAAGAA	AACATGGCAGCAACGGTGAGGTAG
<i>GAPDH</i>	CAD67717	AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT	AACTGGTACGCGAAAGCCATT
<i>CYP356A1</i>	EF645271	ATGAACCCGCGAAACCA GA	TAAATTCGGCTTCACGCCCT
<i>HSP70</i>	ABJ55915	ACCCGTTCCAGAGTTCTTG GGTIT	ATCGGACGAGGGCCACAGTTATTT
<i>FABP</i>	EU069496	TCCGACGGAAAGATGACGCTTT	ACGCCATTGCATGTTGCTGT
<i>GST-O</i>	AJ557141	TGATGAGTTCACCCCGCAA	TTCAAACCATG GCCACAGCA
<i>GST-II</i>	AJ557140	CACCATTACGACTTTGTGGCAGA	TCAGCCATTTCGGTAGCCTCTCT
<i>SOD</i>	AJ496219	GGCCCTCAATCCATCATTGGAAGA	TGATACCGATCACTCCACAAGCCA
<i>CAT</i>	EF687775	AGCTAATCGTTTGTCTG CCGAGGA	ACACTTTGGTCACATCGAACGGGT
<i>G6PDH</i>	AM076951	TCTCAAGGCTGGCTGTATGTCCAA	TGCCGAGATAATGGTCGATTCCGT

Para obtenção dos níveis de eficiência recomendados para o método, foram realizadas padronizações utilizando curvas de concentração de amostra e iniciadores. As reações de qRT-PCR foram

realizadas em duplicata em um volume total de 20 μ L utilizando o kit Quantifast® SYBR Green PCR Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Os níveis de transcrição gênica foram analisados utilizando um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Corbett Life Science). As reações de amplificação dos genes normalizadores (*Tubulina β* , *GAPDH*) foram utilizadas para o cálculo dos níveis de transcrição de cada gene entre os diferentes grupos pelo método do $\Delta\Delta$ CT (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.01.

Determinação da qualidade de água

Amostras de água foram coletadas em uma profundidade de 10 cm no início da exposição, após 24 de exposição e após 14 dias de exposição. Foram utilizados frascos plásticos estéreis com tampa roscável. As análises foram realizadas no mesmo dia da coleta para a contagem de bactérias termotolerantes (coliformes fecais, CF), detergentes (DTG), matéria orgânica (MO) e óleos e graxas (O/G) de acordo com protocolos padronizados (CLESCERI; GREENBERG; EATON, 1998).

Análises dos contaminantes orgânicos

As amostras de ostras e sedimento coletadas (ostras: n=10; sedimento: 250 g) foram preservadas em freezer -80°C até o processamento e análise dos contaminantes. As análises foram realizadas para a caracterização dos locais (sedimento), para verificação das condições iniciais do transplante (bioacumulação em ostras de SAM) e bioacumulação devido à exposição (RIB, LIS e BUC).

O processo de preparo das amostras para as análises foi semelhante. As amostras foram desidratadas durante 72 h em liofilizador (Thermo Savant, módulo D), maceradas, homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente para posteriores análises.

Bioacumulação em *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário

O procedimento metodológico foi baseado em MacLeod et al. (1986) com algumas modificações.

Um grama de cada uma das amostras foi extraído com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em soxhlet durante 8 horas. Antes da extração foram adicionados 100 μL dos padrões surrogate com diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. Para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram adicionados naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); para os bifenilos policlorados (BPCs) e pesticidas organoclorados foram utilizados o PCB-103 e PCB-198 ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); o padrão interno dos alquilbenzeno lineares (LABs) foi o dodecil alquilbenzeno ($1\text{C}_{12}\text{LAB}$, $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída cinco vezes com n-hexano, e 1 grama de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e adicionados os padrões internos (benzo(b)fluoranteno- d_{12} para HPAs, TCMX para BPCs e pesticidas e $1\text{C}_{19}\text{LAB}$ para os LABs). As amostras foram avolumadas em 1 mL.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) da Agilent Technologies para análise de pesticidas organoclorados. Os demais grupos de compostos (HPAs, HAs, BPCs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies.

A identificação dos pesticidas, HPAs, HAs, PCBs e LABs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA e Fluka, Suíça. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados também através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z). A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Análises de contaminantes no sedimento

Uma alíquota de 20 g foi extraída em sistema Soxhlet para análise dos BPCs, pesticidas organoclorados, esteroides (Ols), hidrocarbonetos alifáticos (HAs), HPAs e LABs com n-hexano/diclorometano 50% (v/v) segundo método descrito em UNEP (1992) e Matos (2002).

Antes da extração foram adicionados os padrões surrogate PCB-103, PCB-198, 5 α -androstanol, naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12, dodecil alquilbenzeno (1C₁₂LAB), hexadeceno e eicoseno em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM). O SRM 1941 e SRM 1944 utilizados foram provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA).

O extrato foi dividido em duas alíquotas para serem submetidas à cromatografia por adsorção em coluna. A fração 1 foi eluída com 20 mL da mistura n-hexano/diclorometano (30%) em coluna contendo 3,2 g de alumina 5% desativada para análise de organoclorados, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, LABs. A segunda fração foi eluída com 20 mL de diclorometano/metanol (50%) para a análise de esteroides.

Antes da injeção das frações foram adicionados padrões internos nas amostras avolumadas a 1 mL: TCMX, 5 α -colestano, benzo(b) fluoranteno d12, nonadecil alquilbenzeno (1-C₁₉LAB) e tetradeceno.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás 6890 da Agilent Technologies equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) para análise de pesticidas organoclorados e com detector de ionização de chama (GC-FID) 6890 para análise de HAs. Os demais grupos de compostos (HPAs, PCBs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N também da Agilent Technologies. A aquisição dos dados foi feita em SIM (single ion monitoring).

Os esteróides da fração 2 foram submetidos à derivatização, com o objetivo de transformá-los em compostos com menor ponto de ebulição, utilizando BSTFA [bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida] + 1% TMCS (trimetilclorosilano) em banho maria por 90 minutos a 65° C. A identificação e quantificação foi feita em GC-FID e a confirmação em GC/MS, modo SCAN.

A identificação dos pesticidas, HAs, HPAs, BPCs, LABs e esteróides foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard e Supelco dos EUA, Fluka da Suíça e

Sigma-Aldrich da Alemanha. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através da razão massa/carga (m/z). A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Análises estatísticas

Os dados foram computados como média e desvio padrão. A estatística foi realizada utilizando o local poluído (BUC) como controle positivo, sendo comparado com as áreas de cultivo (BUCxLIS; BUCxRIB). Os dados foram submetidos à verificação de *outliers* (teste de Grubbs), testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e, de acordo com os resultados, submetidos a teste paramétrico (teste “*t*” de Student) ou não paramétricos (Mann-Whitney). Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.01.

Resultados

Qualidade de água

As amostras de água coletadas durante o experimento (T_{zero} , 24h e 14d) mostram a diferença existente entre as áreas de cultivo (SAM, LIS e RIB) e o local contaminado (BUC). Todos os parâmetros analisados indicam a presença significativa de efluentes de esgoto sanitário na região contaminada no BUC (Figura 3).

A concentração de CF nas amostras de água do local contaminado (BUC; T_{zero} , 24h, 14d) confirmaram a presença de contaminação fecal no BUC, com 1.100, 80.000 e 80.000 NMP por 100 ml, respectivamente (Figura 3). Além disso, foram detectados níveis mais elevados de DTG, MO e O/G neste local, comparado aos demais locais, evidenciando o importante aporte antrópico nesta área (Figura 3).

Em relação aos locais de cultivo, foi observado os maiores valores de CF em RIB 14d (240 NMP.100 mL⁻¹) e em LIS 24h e 14d (30 NMP.100 mL⁻¹). Os valores observados para MO em LIS podem estar relacionados com as características do sedimento lodoso encontrado no local (Figura 3).

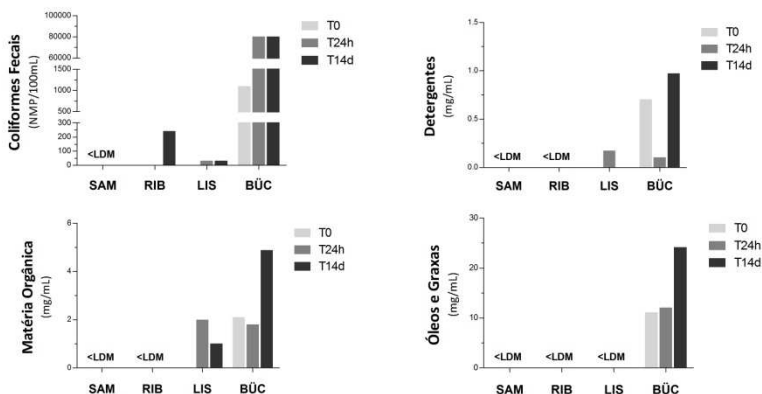


Figura 3 - Indicadores de qualidade analisados em amostras de água do mar obtidas no início (Tzero), 24h e após 14 dias de exposição no campo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler.

Contaminantes orgânicos em sedimento

A análise de sedimento apresentou uma maior concentração de pesticidas (Σ DDT) em SAM quando comparada com outros locais analisados (3 - 7,5 vezes mais) (Figura 4). Os resultados de hidrocarbonetos alifáticos totais (Σ HA), alquilbenzenos lineares totais (Σ LAB) e esteróis fecais foram superiores no local contaminado (BUC) (Figuras 4 e 5). Os maiores níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais (Σ HPA) foram observados nas amostras do BUC, no entanto quantidades menores de HPAs também foram identificadas em SAM, LIS e RIB (Figura 4).

A análise de sedimentos identificou a presença de coprostanol em BUC, importante biomarcador geoquímico de contaminação de origem fecal. Os valores em BUC ($2,55 \mu\text{g.g}^{-1}$) foram 30-125 vezes maiores do que aqueles observados nos outros locais (SAM: $0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$; RIB: $0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$; LIS: $0,05 \mu\text{g.g}^{-1}$). Algumas relações entre esteróis fecais são sugeridas como indicativos de contaminação por esgoto sanitário. Estas relações propostas foram maiores em BUC em relação aos demais pontos monitorados (Figura 5).

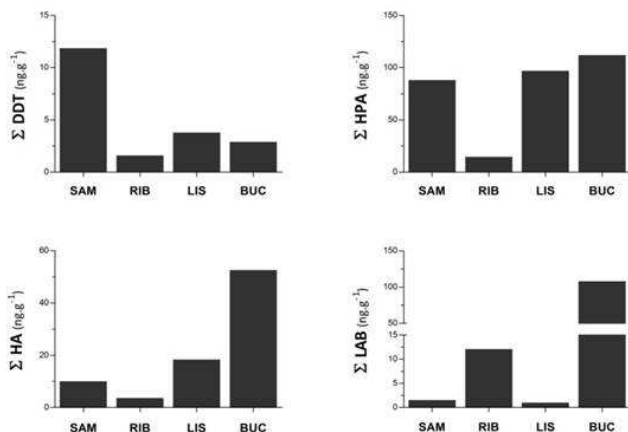


Figura 4 - Níveis de contaminantes orgânicos detectados em amostras de sedimento coletadas nos locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler.

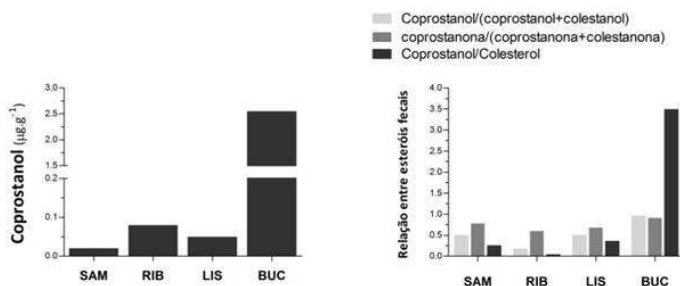


Figura 5 - Níveis de Coprostanol e relação entre esteróis encontrados em sedimento dos diferentes locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler.

Contaminantes bioacumulados em ostras *C. gigas*

Após 14 dias de exposição, os animais expostos no local contaminado (BUC) apresentaram maiores concentrações de ΣHA, ΣHPA, ΣLAB do que os animais mantidos nos demais locais estudados. Os animais demonstraram uma eficiente capacidade de bioacumular HPAs (11 - 81 vezes) e LABs (22 - 42-vezes). Considerando a

acumulação inicial de Σ HPA em SAM (19,6 ng.g^{-1}), observamos uma acumulação diária de aproximadamente 8,5 e 8,2 ng.g^{-1} em RIB e LIS e 112,5 ng.g^{-1} em BUC. Para Σ LAB, a acumulação diária foi de 1,3 e 93,4 ng.g^{-1} em RIB e BUC, respectivamente. Os valores de LAB em LIS foram menores do que os observados em SAM (32,1 e 42,3 ng.g^{-1} , respectivamente). Os valores observados para Σ DDT em RIB, LIS e BUC (1,96; 2,03; 2,05 ng.g^{-1} , respectivamente) podem estar relacionados com a condição inicial destes animais em SAM (1,96 ng.g^{-1}) (Figura 6).

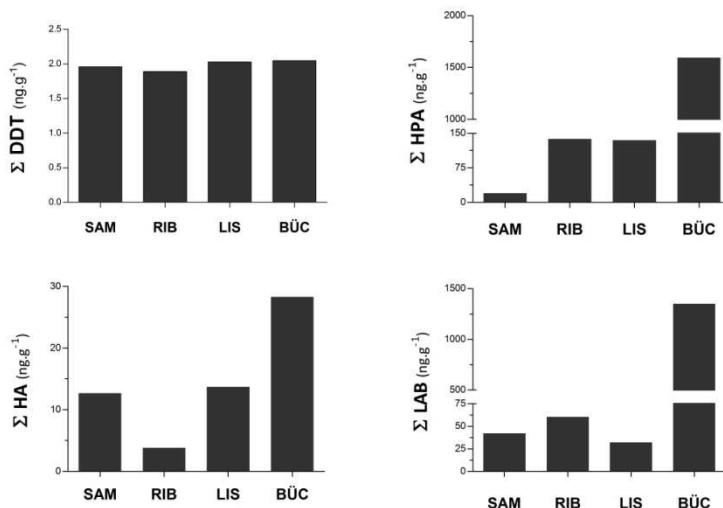


Figura 6 - Níveis de contaminantes orgânicos bioacumulados em ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias nos diferentes locais de estudo. Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler.

Foram analisados trinta e sete diferentes tipos de HPAs analisados, sendo que vinte e cinco foram identificados na exposição. Todos estes compostos foram encontrados no BUC, sendo que doze compostos foram acumulados somente nas ostras expostas neste local. Dentre os compostos, foi observada uma maior concentração de fenantreno, fluoranteno, pireno e reteno em ostras do BUC. Naftaleno não foi encontrado em SAM ($<\text{LDM}$), porém foi acumulado de forma semelhante pelas ostras mantidas no local contaminado (40,3 ng.g^{-1}) e outras áreas de cultivo (RIB: 37,2 ng.g^{-1} ; LIS: 38,2 ng.g^{-1}) (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de *Crassostrea gigas* (ng.g⁻¹ peso seco) do Tempo zero (SAM) e expostas por 14 dias nas diferentes áreas de estudo (RIB, LIS, BUC).

Composto	SAM	RIB	LIS	BUC
Naftaleno	<LDM	37,2	38,2	40,3
ΣMetilnaftalenos	<LDM	13,5	21,7	79,2
Bifenil	<LDM	<LDM	5,05	16
ΣEtilnaftalenos	<LDM	<LDM	<LDM	31,1
ΣDimetilnaftalenos	<LDM	<LDM	<LDM	311
Acenaftileno	<LDM	5,31	16,1	25,6
Acenafteno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
ΣTrimetilnaftalenos	14,3	19,7	17,8	605
Fluoreno	<LDM	<LDM	<LDM	17,4
Σ Metilfluorenos	<LDM	<LDM	<LDM	47
Dibenzotiofeno	<LDM	<LDM	<LDM	7,48
Fenantreno	<LDM	18,9	11,3	73,4
Antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	5,47
ΣDimetilfluorenos	<LDM	<LDM	<LDM	27,9
Σ Metildibenzotiofenos	<LDM	<LDM	<LDM	12,8
ΣMetilantracenos	<LDM	<LDM	<LDM	118
ΣDimetilfenantrenos	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
ΣMetilfenantrenos	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Fluoranteno	<LDM	17,9	12,2	47,9
Pireno	<LDM	11,3	9,91	46,8
ΣMetilfluorantenos	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Reteno	<LDM	<LDM	<LDM	11
ΣMetilpirenos	<LDM	<LDM	<LDM	8,8
Benzo(c) Fenantreno	<LDM	3,82	<LDM	4,98
Benzo(a)Antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Criseno	<LDM	6,61	<LDM	24,1
ΣMetilcrisenos	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
ΣDimetilcrisenos	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Benzo(b)fluoranteno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Benzo(j/k)fluoranteno	<LDM	<LDM	<LDM	2,55
Benzo(e)pireno	<LDM	<LDM	<LDM	4,93
Benzo(a)pireno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Perileno	5,26	<LDM	<LDM	22
Indeno [1,2,3-c,d]pireno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Dibenzo(a,h)antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Benzo(b)criseno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Benzo(g,h,i)perileno	<LDM	3,49	<LDM	2,75
ΣHPAs	19,6	138	135	1594

Legenda: SAM – Praia do Sambaqui; RIB – Praia do Ribeirão da Ilha; LIS – Praia de Santo Antônio de Lisboa; BUC – Foz do Rio Bücheler. <LDM: abaixo do limite de detecção do método.

Biomarcadores moleculares

As análises de qRT-PCR foram realizadas utilizando a *Tubulina β* como gene normalizador em amostras de glândula digestiva e *GAPDH* para as amostras de brânquias de *C. gigas* e os resultados obtidos dos animais mantidos nas áreas de cultivo (RIB e LIS) foram comparados com BUC (RIBxBUC - LISxBUC). O local poluído foi utilizado como um local referência positivo.

Em glândula digestiva, níveis significativamente maiores de transcritos de *GST- α* foram observados quando comparados os grupos BUCxLIS (7 vezes) e de *HSP70* quando comparados BUCxRIB (2 vezes). Uma menor transcrição do gene *GST- β* foi observada nas ostras expostas no BUC quando comparado com RIB (2,5 vezes) (Figura 7A). Os níveis de transcritos dos genes *SOD*, *CAT*, *G6PDH*, *FABP* e *CYP356A1* na glândula digestiva dos animais não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 7B).

As análises realizadas nas brânquias apresentaram diferenças significativas na transcrição dos genes *FABP*, *GST- α* , *CAT* e *HSP70* entre as ostras do local poluído e os das áreas de cultivo. Foi observada uma maior transcrição entre BUC e RIB (2,85 vezes) e BUC e LIS (9,55 vezes) para o gene *FABP*. O gene *GST- α* apresentou uma transcrição ainda maior nos animais mantidos no BUC, variando entre 7 e 22 vezes mais do que aqueles das áreas de cultivo (RIB e LIS, respectivamente). O gene *CAT* apresentou uma menor transcrição em ostras do BUC em comparação aos locais RIB e LIS e *HSP70* em BUC quando comparado com RIB (Figura 8A). Os transcritos dos genes *SOD*, *GST- β* , *G6PDH* e *CYP356A1* não apresentaram diferença entre os locais (Figura. 8B).

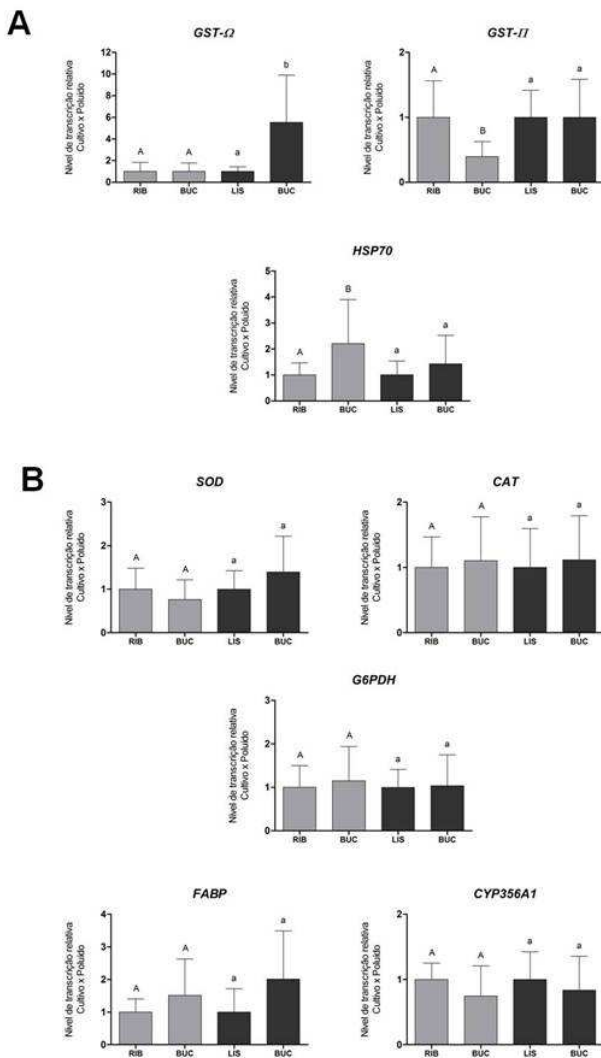


Figura 7 - Transcrição de genes de amostras de glândula digestiva de *Crassostrea gigas* expostas 24 horas in situ em diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina. RIB: Ribeirão da Ilha, cultivo baía Sul; LIS: Santo Antônio de Lisboa, cultivo baía Norte; BUC: rio Bücheler, controle positivo. Letras maiúsculas representam a estatística entre RIB e BUC. Letras minúsculas representam a estatística entre LIS e BUC. ($p < 0,05$).

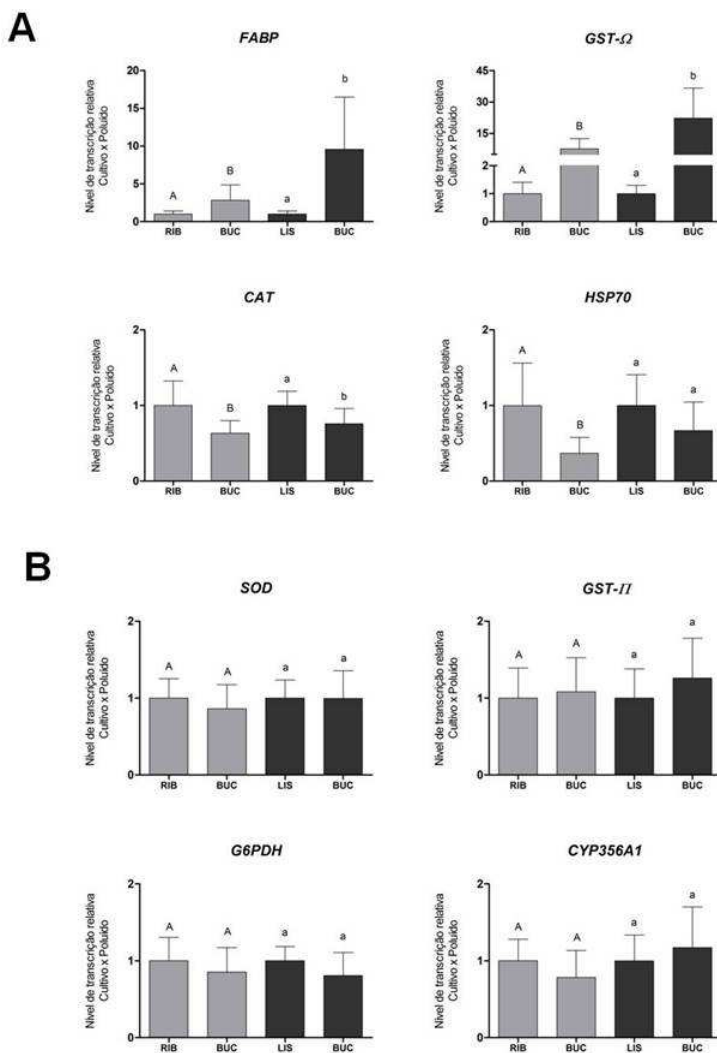


Figura 8 - Transcrição de genes de amostras de brânquias de *Crassostrea gigas* expostas 24 horas in situ em diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina. RIB: Ribeirão da Ilha, cultivo baía Sul; LIS: Santo Antônio de Lisboa, cultivo baía Norte; BÜC: rio Bücheler, controle positivo. Letras maiúsculas representam a estatística entre RIB e BUC. Letras minúsculas representam a estatística entre LIS e BUC. ($p < 0,05$).

Discussão

Analizamos neste estudo a transcrição de genes em brânquias e glândula digestiva de *C. gigas* após 24 horas de exposição *in situ* em áreas de cultivo e em uma área contaminada pelo lançamento de esgoto sanitário. Visando a identificação de novas ferramentas para monitoramento ambiental, foi analisada a transcrição de genes potenciais biomarcadores moleculares em ostras expostas a uma região contaminada por esgoto sanitário e em áreas aquícolas.

Foram utilizados iniciadores selecionados através de sequências disponíveis no *GenBank*® (www.ncbi.nlm.nih.gov), resultados de pesquisas anteriores de nosso grupo oriundos de uma biblioteca subtrativa supressiva de genes transcritos por ostras *C. gigas* expostas a esgoto sanitário em laboratório (MEDEIROS et al. 2008a) e resultados não publicados. Os resultados observados neste experimento demonstram o impacto do esgoto sanitário na região, destacando a necessidade de implementação de sistemas eficientes de coleta e tratamento de esgoto sanitário.

Caracterização dos níveis de contaminantes na água, sedimento e ostras

Os valores de coliformes fecais (CF) quantificados durante o experimento *in situ* em alguns locais de estudo ultrapassaram o limite definido pela Resolução Conama N° 357/2005 (CONAMA, 2005), que estabelece em 43 NMP/100 ml para áreas próprias de cultivo de moluscos marinho. Da mesma forma, a ANZECC (*Australian and New Zealand Environmental Conservation Council*) refere-se como limite para contatos primários os valores de 150 NMP/100 ml (SHAH et al., 2007).

Segundo o CSSP (*Canadian Shellfish Sanitation Program*) o limite para cultivos de moluscos é de 14 NMP/100ml, sendo que apenas 10% das amostras podem exceder 43 NMP/100ml (CSSP, 2008). Os níveis de CF no local contaminado BUC chegaram a atingir um valor de 80.000 NMP por 100 ml. Níveis de CF foram também detectados na amostra do Ribeirão da Ilha no dia 14 do experimento (240 NMP.100 mL⁻¹). Em LIS, baixos níveis de CF foram detectados após 24h e 14 dias de exposição (30 NMP.100 mL⁻¹ em ambas coletas).

Os LABs podem ter como origem o esgoto sanitário ou industrial que não sofrem tratamento adequado antes de serem descartados em rios ou oceanos (TAKADA; ISHIWATARI; OGURA, 1992). Os níveis de LABs observados no sedimento coletado nas áreas SAM e LIS foram semelhantes (1,56 e 0,99 ng.g⁻¹, respectivamente) e considerados baixos quando comparado com os valores encontrados em BUC (108 ng.g⁻¹). Possivelmente a semelhança dos resultados possa ter relação com a proximidade das duas áreas de estudo e ausência de um aporte significativo de esgoto sanitário nessas regiões.

Apesar de identificado LABs no sedimento coletado em RIB e este ser superior aos outros locais de cultivo (12,1 ng.g⁻¹), este valor ainda pode ser considerado como um índice de poluição de baixo impacto. Uma possível fonte de esgoto sanitário pode existir nesta região, visto que foi observada a presença de coliformes fecais nas amostras de água nesta área na coleta de 14 dias (240 NMP.100 mL⁻¹).

O valor encontrado para os LABs no sedimento na região do BUC (108,0 ng.g⁻¹) foram semelhantes aos encontrados em regiões estuarinas urbanizadas (ISOBE et al., 2004; MEDEIROS et al., 2005; MEDEIROS; BÍCEGO, 2004; TSUTSUMI et al., 2002) e maiores quando comparados com dados de regiões costeiras de mar aberto (MACÍAS-ZAMORA; RAMÍREZ-ALVAREZ, 2004).

Assim como no sedimento, uma maior concentração de LABs também foi observada nas ostras mantidas em BUC. As concentrações de LABs foram 20 a 40 vezes superior nas ostras mantidas no BUC comparado com SAM, RIB e LIS (1350,0; 42,3; 60,4; e 32,1 ng.g⁻¹, respectivamente). Tsutsumi e colaboradores (2002) relataram concentrações de LABs entre 10 e 1640 ng.g⁻¹ em mexilhões na costa sul e sudeste da Ásia. Animais coletados na região metropolitana de Tóquio apresentaram altas concentrações de LABs (1000-1760 ng.g⁻¹), enquanto as regiões afastadas da cidade apresentaram concentrações mais baixas (71-350 ng.g⁻¹).

Os resultados do presente estudo e da literatura mostram que a concentração de LABs nos tecidos de bivalves reflete uma proximidade com centros urbanos e pode ser um marcador de contaminação ambiental por efluentes urbanos. Importante destacar que os níveis de LABs observados nas ostras de SAM (42,3 ng.g⁻¹) refletem os valores iniciais da exposição, pois os animais foram transplantados deste local para os demais locais. Assim, após 14 dias de exposição dos animais no BUC bioacumularam mais de 1300 ng.g⁻¹ de LABs, o que indica uma taxa de bioacumulação diária de cerca de 93,4 ng.g⁻¹, evidenciando uma

alta exposição a esses compostos e comprovando a contaminação por esgoto sanitário no BUC.

O coprostanol e outros esteróis fecais (ex. colestanol e colesterol) podem persistir no ambiente, especialmente nos sedimentos, tornando dúbias informações sobre uma recente contaminação fecal (ISOBE et al., 2002; SAVICHTCHEVA; OKABE, 2006). O coprostanol é um dos principais esteróis fecais excretado por mamíferos (SAVICHTCHEVA; OKABE, 2006). O coprostanol é hidrofóbico, sendo facilmente associado com partículas presentes no esgoto, podendo ser incorporado nos sedimentos e preservado por um longo tempo sob condição de anoxia sem significativa biodegradação (ISOBE et al., 2002).

Segundo Nichols e colaboradores (1993), valores acima de 0,5 µg/g de coprostanol estão na faixa de concentração de regiões poluídas muito próximas às descargas de esgoto. Sedimentos com valores de coprostanol acima de 0,01 µg/g têm sido considerados como provenientes de áreas contaminadas por esgoto (WRITER et al., 1995). Leeming e Nichols (1996) sugerem que valores entre 0,06 e 0,4 µg/g limitam a utilização as águas para contatos primários e secundários em ambientes estuarinos.

O colestanol pode ser produzido por organismos fitoplanctônicos e também como intermediário nas transformações do colesterol. O colesterol é um precursor do coprostanol encontrado no trato digestivo dos mamíferos, em ovos, leites e gorduras e, por conseguinte, não é tão específico para a contaminação fecal (SAVICHTCHEVA; OKABE, 2006).

Algumas relações entre esteróis fecais foram propostas para identificar a contaminação por esgoto sanitário. Valores acima de 1,0 para a relação [(coprostanol/colesterol)] indicam a presença de esgoto sanitário bruto (MUDGE; NORRIS, 1997). O valor de 3,49 para esta relação foi encontrado em BUC corroborando com a hipótese de contaminação de origem fecal (SAM: 0,25; RIB: 0,04; e LIS: 0,36).

De forma semelhante, Grimalt e colaboradores (1990) propõem uma relação entre [coprostanol/(colesterol/colestanol)], identificando a contaminação com valores acima de 0,06. No presente estudo, a maior relação foi observada em BUC em relação a SAM, RIB e LIS (0,96; 0,5; 0,17; e 0,5; respectivamente) (Fig. 5).

Porém, se considerarmos esta relação de Grimalt e colaboradores (*op. cit*), todas as áreas de estudo estariam contaminadas por esgoto sanitário. No entanto, conforme mencionado anteriormente, tais informações sugerem estudos mais aprofundados, uma vez que alguns

desses parâmetros são mais persistentes e torna-se difícil afirmar se este aporte de colestanol ou colesterol é recente ou não.

A entrada dos pesticidas organoclorados no ambiente marinho pode ocorrer de diversas maneiras, tais como pelo carreamento dos compostos pelas chuvas, lençóis freáticos e rios (CLARK, 2001). Ocorre também a introdução devido ao transporte atmosférico dos defensivos que se dispersam durante a sua aplicação e se associam à matéria orgânica na água (CLARK, 2001).

O grupo dos DDTs é fortemente absorvido aos detritos e partículas de sedimentos. Apesar de identificada a presença do composto no sedimento em um dos locais de monitoramento deste estudo (SAM: 11,86 ng.g⁻¹), os valores acumulados nas ostras (1,89 – 2,05 ng.g⁻¹ peso seco) podem ser considerados baixos se comparados com aqueles em que houve uma aplicação direta de DDT no ambiente, bem como abaixo da concentração máxima permitida para o consumo humano pela *Environmental Protection Agency* (EPA) que é de 14,4 ng.g⁻¹ (ZHOU; ZHU; KONG, 2008).

A identificação do ΣDDT bioacumulado em ostras deste estudo possivelmente tem relação com a condição inicial (T_{zero}) encontrada no sedimento do local de origem dos animais (SAM - Fig. 4) e nas ostras deste local (Fig. 6). Os bivalves analisados da região nordeste do Brasil por Taniguchi (1995) e Sericano e colaboradores (1995), dentro do programa *International Mussel Watch*, apresentaram altos níveis de DDT nas amostras coletadas em São Luís do Maranhão (184,73 ng.g⁻¹ peso seco) e Fortaleza (130,0 ng.g⁻¹ peso seco).

Nessas regiões, o DDT foi aplicado em grande escala para combater o vetor transmissor da malária. Tavares e colaboradores (1988) determinaram valores baixos (6,0 ng.g⁻¹ peso seco, considerando 80% de umidade) de DDTs em bivalves da Baía de Todos os Santos, tais valores são mais próximos às concentrações encontradas neste trabalho (1,89 – 2,05 ng.g⁻¹ peso seco).

Existem várias fontes de hidrocarbonetos para o ambiente e, por isso, sua distribuição varia muito de um local para outro e tende a ser maior em áreas urbanizadas (LAFLAMME; HITES, 1978; MAI et al. 2003; BOEHM, 2005; WALKER et al. 2005; BOONYATUMANOND et al. 2006; DHANANJAYAN; MURALIDHARAN; PETER, 2012).

Quantidades consideráveis de hidrocarbonetos, provenientes do petróleo e derivados, são introduzidas no ambiente marinho através de drenagem urbana, efluentes domésticos e industriais, atividades náuticas, derrames, entre outros (CLARK, 2001). Além disso, existem

os hidrocarbonetos provenientes de fontes naturais como as plantas terrestres, animais, bactérias, microalgas e macroalgas. Uma fração dos hidrocarbonetos é assimilada pela biota, perdida por evaporação, foto-oxidação, biodegradação, entre outros processos. Entretanto, grande parte desses compostos se deposita no sedimento, podendo permanecer durante anos (VOLKMAN et al., 1992).

A concentração de alifáticos totais encontrada nas amostras de sedimento de Florianópolis variou de 3,67 a 52,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco. A concentração mais alta foi encontrada na amostra BUC (Fig. 4). Concentrações de alifáticos totais encontrados em sedimentos não poluídos normalmente apresentam valores médios de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (UNEP, 1992; NRC, 1985), chegando a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ em sedimentos estuarinos e até maiores onde há contribuição significativa de plantas superiores (VOLKMAN et al., 1992).

O grau de contaminação por petróleo ou derivados de uma determinada região pode ser avaliado pela quantidade e distribuição individual de hidrocarbonetos encontrados no sedimento (FARRINGTON et al., 1977). Em sedimentos com concentrações menores do que 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, uma análise detalhada dos hidrocarbonetos individuais é requerida para avaliar a magnitude da contribuição antropogênica (READMAN et al., 2002).

É necessário, portanto, que os dados de hidrocarbonetos sejam interpretados através de alguns parâmetros para a sua distinção, ou seja, se são provenientes de origem biogênica ou antropogênica. Um dos métodos para se diferenciar a origem dos hidrocarbonetos do petróleo é o Índice de Preferência de Carbonos (CPI).

Valores de CPI próximos a 1 indicam uma contribuição de contaminação por hidrocarbonetos provenientes do petróleo e matéria orgânica degradada, enquanto que valores maiores e acima de 1 apresentam de forma crescente uma contribuição biogênica predominante (BOULOU BASSI et al., 1997). Todos os valores de CPI nas amostras foram maiores do que 1 (SAM: 9,01; LIS: 5,91; RIB: 24,3; BUC: 3,38 – dados não mostrados), indicando que há predominância na introdução de hidrocarbonetos provenientes de plantas superiores na área de estudo. De fato, o ponto RIB é o que apresenta menor área urbanizada e com maior cobertura vegetal, ao contrário de BUC.

Outro importante indicador da presença de hidrocarbonetos do petróleo, em sedimentos, na análise por cromatografia em fase gasosa, é a elevação na linha de base do cromatograma, à qual é atribuído o nome

de Mistura Complexa Não Resolvida (MCNR) (FARRINGTON et al., 1977; NRC, 1985).

Essa elevação é caracterizada por uma mistura de compostos ramificados e cíclicos presentes no petróleo e que não podem ser separados por essa técnica. Normalmente, estão associados aos compostos de petróleo resistentes à degradação e persistentes em sedimentos, enquanto os compostos com estruturas mais simples degradam-se mais facilmente (VOLKMAN et al., 1992; NRC, 1985). As amostras de sedimento do RIB apresentaram MCNR abaixo do limite de detecção (dados não mostrados). Maiores valores de MCNR foram identificados em BUC ($45,7 \mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto que LIS e SAM apresentaram concentrações de MCNR de 14,1 e $6,44 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (dados não mostrados). O valor encontrado em BUC pode ter relação com a presença de HPAs (dados não mostrados).

Os HPAs originam-se da queima de combustíveis fósseis e derivados, e em menor proporção da queima de biomassa vegetal e diagênese de precursores naturais (LAW; BISCAYA, 1994). A concentração encontrada em ostras expostas por 14 dias em BUC ($1594,0 \text{ ng.g}^{-1}$) são superiores às relatadas por Sericano e colaboradores (1995) para mexilhões em regiões que sofrem com a introdução de esgoto sanitário, industrial e de contaminantes provenientes de portos (380 e 740 ng.g^{-1} peso seco). Uma avaliação realizada em *Mytilus edulis* na Baía do rio Sena (França) apresentou valores de HPAs próximos aos encontrados neste estudo ($15,2$ e $447,0 \text{ ng.g}^{-1}$) (ROCHER et al., 2006).

Baumard e colaboradores (1998) consideram que o ambiente tem baixo grau de poluição por HPAs quando são encontrados no sedimento valores de 0 e 100 ng.g^{-1} e moderado grau de poluição valores entre 100 e 1000 ng.g^{-1} . Considerando a escala de Baumard e colaboradores (1998), o valor de HPAs de BUC se classifica como moderado ($112,1 \text{ ng.g}^{-1}$), enquanto os HPAs de SAM, LIS e RIB estão dentro da faixa de baixo grau de poluição ($88,2$; $96,9 \text{ ng.g}^{-1}$ e $14,9 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente).

Dentre os compostos de HPAs acumulados em ostras mantidas no local contaminado (Tabela 3), observamos a presença de fenantreno, pireno, fluoranteno, reteno e metabólitos de naftaleno. Lückmann e colaboradores (2012) observaram a bioacumulação destes compostos em ostras *Crassostrea brasiliana* expostas por 96 horas a fração acomodada em água do óleo diesel. Desses compostos, apenas o reteno não está incluído na lista dos dezesseis HPAs contaminantes prioritários da USEPA (e. g. *United States Environmental Protecting Agency*) (JOA et al. 2009).

Apesar do fenantreno e pireno serem considerados hidrocarbonetos não-cancerígenos (PHILLIPS, 1999), a avaliação dos seus efeitos em organismos aquáticos é de uma importância indiscutível. O fenantreno é um composto tóxico para diversos organismos aquáticos, com estudos demonstrando os efeitos no sistema imune de moluscos bivalves (HANNAM et al., 2010), causando estresse oxidativo em peixes (JEE; KANG, 2005; SUN et al., 2006; YIN et al., 2007) e alterando as funções reprodutivas de ouriços-do-mar (SCHÄFER; KÖHLER, 2009).

Isoladamente, a ocorrência do pireno como contaminante ambiental é considerada rara, devendo-se considerar efeitos aditivos, sinérgicos e potenciação deste composto com outros HPAs (ex. benzo[a]pireno) (OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012). Pesquisas demonstraram a toxicidade isolada do pireno em organismos aquáticos como microalgas (OKAY; TÜFEKÇİ; DONKIN, 2002; PETERSEN; REICHENBERG; DAHLLÖF, 2008), copépodes (HJORTH et al, 2007), mexilhões (OKAY et al., 2006) e peixes (SCHIRMER et al, 1998; INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004; OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012). A biodisponibilidade e bioacumulação de pireno em moluscos podem ainda estar relacionadas com o teor de matéria orgânica do sedimento (VERRENGIA-GUERRERO et al. 2003).

De forma semelhante ao pireno, o fluoranteno aparentemente possui efeito sinérgico com outros xenobióticos. Al-Subiai e colaboradores (2012), em estudo para verificar efeitos do fluoranteno em mexilhões *Mytilus* sp., observaram que os danos são maiores quando combinado com outro contaminante. O fluoranteno é frequentemente encontrado em ambiente estuarino e é um dos HPAs mais concentrados em sedimento, partículas em suspensão e água (BAUMARD et al. 1998). Pesquisas demonstraram o estresse oxidativo causado por fluoranteno em crustáceos (RODRIGUES et al. 2013), alterações histológicas em ostras (WEINSTEN, 1997) e no sistema imune de mexilhões (COLES; FARLEY; PIPE, 1994).

Apesar do reteno (1-metil-7-isopropilfenantreno) não estar incluído na lista de HPAs prioritários da USEPA (JOA et al. 2009), seus efeitos em organismos aquáticos já foram observados. O reteno, fenantreno derivado de fontes naturais e antropogênicas, é um modelo de estudos de toxicidade de alquilfenantrenos (SCOTT et al. 2011). Os alquilfenantrenos são constituintes do petróleo bruto e têm sido implicados na toxicidade do petróleo em peixes e presença de efeitos

teratogênicos (BAUDER; PALACE; HODSON, 2005; BILLIARD; QUERBACH; HODSON, 2009; SCOTT et al. 2011; HAWLICZEK et al. 2012), genotóxicos (MARIA; CORREIA; SANTOS, 2005; GRAVATO; SANTOS, 2002), imunotóxicos (HOGAN et al. 2010) e como indutores de estresse oxidativo em peixes (HODSON et al. 2007; SCOTT; HODSON, 2008).

Respostas moleculares dos animais expostos

Entre os biomarcadores moleculares analisados como potenciais ferramentas para o monitoramento da contaminação ambiental por esgoto sanitário, os genes que apresentaram os melhores resultados estão os genes da *FABP* e da *GST-Ω*. Pesquisas anteriores indicavam o potencial destes genes para a utilização como biomarcadores de contaminação aquática por esgoto sanitário (MEDEIROS et al. 2008 a, b; SIEBERT et al. 2009).

As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs) são pequenas proteínas citosólicas que se ligam não-covalentemente a ligantes hidrofóbicos, principalmente ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (ESTEVES; EHLRICH, 2006). Estas proteínas desempenham um papel funcional no transporte intracelular e metabolismo de lipídeos.

As FABPs transportam uma variedade de compostos hidrofóbicos além dos ácidos graxos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (ESTEVES; EHLRICH, 2006; STORCH; THUMSER, 2000). Contudo, a alta concentração de FABP em hepatócitos e enterócitos (~ 3 - 6% de todas as proteínas citoplasmáticas) excede a concentração de ácidos graxos disponíveis (VELKOV et al., 2005). Assim, novas funções biológicas como participação na transdução de sinal e regulação da transcrição gênica estão sendo investigadas (ESTEVES; EHLRICH, 2006).

Neste estudo, as respostas transcricionais para o gene *FABP* diferiram bastante entre as ostras expostas no BUC em relação às ostras mantidas nas áreas de cultivo (LIS e RIB). Medeiros e colaboradores (2008b), observaram altos níveis de transcritos por PCR semi-quantitativo do gene *FABP* em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário. Contudo, deve-se ressaltar que ainda não se conhece o mecanismo de modulação da transcrição gênica da *FABP* em *C. gigas*. Experimentos devem ser realizados com o intuito de conhecer os

contaminantes presentes no esgoto sanitário capazes de promover a indução da transcrição desse gene em *C. gigas*.

No presente estudo, a transcrição de *GST-Ω* nas brânquias e na glândula digestiva das ostras expostas na área do BUC, chegaram a níveis 20 vezes e 7 vezes maiores, respectivamente, do que os observados nos animais mantidos em LIS (BUCxLIS) (Figuras 7 e 8). Este gene também estava significativamente elevado nas brânquias dos animais do BUC, quando comparados aos animais do RIB (Figura 8). As Glutathione *S*-transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas multifuncionais de biotransformação de contaminantes orgânicos de fase II, que conjugam o tripeptídeo glutathione com uma variedade de compostos eletrofílicos. Também desempenham um papel fundamental no processo de eliminação de EROs, na regulação do equilíbrio redox da célula, na prevenção de danos de membrana celular e outras macromoléculas e como resposta do sistema imune inato (KIM et al., 2009; KONINGS; PENNINGA, 1985; SIRITANTIKORN et al., 2007; WANG et al. 2013).

Boutet, Tanguy e Moraga (2004) observaram um aumento do nível transcricional no mRNA do gene *GST-Ω* em ostras *C. gigas* após três dias de exposição a hidrocarbonetos. Em outro estudo com a espécie *C. brasiliana*, o nível de transcritos do gene *GST-Ω* apresentou um aumento de 9 vezes após uma exposição a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno por 24 horas (LÜCHMANN, 2012). Corroborando os resultados obtidos, Toledo-Silva (2009) observou um aumento de 8,5 vezes na transcrição do gene *GST-Ω* em glândula digestiva de ostras após 24 horas de exposição no BUC, valores semelhantes foram encontrados neste estudo (7x em BUCxLIS).

Observada a bioacumulação de HPAs pelas ostras em BUC e os resultados obtidos nesses estudos supracitados, a *GST-Ω* poderia ser modulada por HPAs. Contudo, ainda são necessários estudos para determinar o substrato dessa isoforma de GST e a atividade enzimática após a exposição a HPAs isolados.

As HSPs constituem uma família de proteínas que auxiliam na proteção ao dano celular como resposta a diferentes estímulos ambientais (temperatura, salinidade, poluentes químicos, metais-traços, invasão de bactérias) auxiliando na manutenção da homeostase em moluscos (WANG et al. 2013).

A família HSP70 é a maior e mais conservada família das HSPs, uma das primeiras a ser induzida sob condições de estresse (GUPTA et al., 2010; PIANO; VALBONESI; FABBRI, 2004; RHEE et al, 2009;

MORALES et al, 2011) e utilizadas como biomarcador em organismos aquáticos (BIERKENS; MAES; PLAETSE, 1998; WASHBURN et al., 2002; WEPENER et al., 2005). Porém, quando tratamos de um experimento de campo, onde a variação dos parâmetros ambientais e contaminantes é altamente dinâmica, o uso das HSPs como biomarcadores pode ser questionável.

Segundo Oehlmann e Schulte-Oehlmann (2003) essa característica inespecífica prejudica a interpretação de uma resposta dos animais frente aos contaminantes ambientais *in situ* (FEDER; HOFMANN, 1999; WERNER; HINTON, 1999). A identificação de respostas das HSPs, seja ela pela regulação positiva ou mesmo negativa, devem ser consideradas como potenciais indicadores de estresse em situações reais de campo (WERNER; HINTON, 1999).

No presente estudo, diferenças entre o nível de transcrição da *HSP70* foram observadas entre os animais mantidos no BUC e o local de cultivo RIB e entre os tecidos analisados (BUC: menor transcrição em brânquias; maior transcrição em glândula digestiva). Padrões de HSPs podem variar entre os tecidos, contaminantes, doses e períodos de exposição (PIANO et al. 2005; TAYLOR et al. 2013).

O conhecimento das respostas basais das HSPs em *C. gigas* em experimentos de campo, frente às variáveis ambientais, contaminantes, isoladamente ou combinados se faz necessário para validá-la como biomarcador de estresse.

Apesar da pouca informação quanto à função específica da GST- Π em moluscos, estudos mostraram uma possível relação entre contaminantes e a atividade de GST ou a expressão do gene *GST- Π* em bivalves. Pesquisadores observaram que a transcrição do gene *GST- Π* foi induzida em moluscos quando expostos a HPAs oriundos de elutriado de sedimento, com a presença de fluoranteno e pireno (GIULIANI et al. 2013) podendo responder de forma diferente de acordo com o tecido analisado (XU et al., 2010; MIAO et al. 2011).

Mexilhões expostos ao benzo[a]pireno em condições controladas apresentaram uma inibição no nível de transcrição de *GST- Π* em glândula digestiva (HORAU et al. 2006), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo onde foi observada uma menor transcrição de *GST- Π* em glândula digestiva das ostras expostas ao local mais contaminado por HPAs (BUC). Além de apresentar uma resposta diferente em cada tecido coletado, em experimentos de campo, a *GST- Π* pode apresentar uma grande variabilidade (HORAU et al. 2006).

A expressão das GSTs pode ser regulada por uma ampla variedade de xenobióticos, sendo complexo obter um padrão de resposta susceptível frente a uma mistura de contaminantes (CARLETTI et al. 2008). Para explicar os resultados obtidos neste estudo, é necessário ressaltar que em estudos de monitoramento *in situ* torna-se difícil estabelecer uma relação causal direta entre a presença de contaminantes e alterações na transcrição gênica. Além disso, a composição química dos efluentes lançados no rio Bucheler é complexa, sendo encontrados também LABs, DDT, HAs, além de diferentes HPAs. Essas substâncias possivelmente alteram o metabolismo normal das ostras, influenciando no processo de transcrição gênica de uma forma diferente da situação em que as ostras estão expostas a um único HPA (*ex.*, benzo[a]pireno).

Os organismos aeróbios expressam um complexo sistema de enzimas de defesa antioxidantes e outras moléculas para manter a homeostase. Idade, sexo, suscetibilidade genética, dieta e os níveis de exposição são fatores importantes que influenciam a capacidade de um organismo de apresentar uma resposta protetora. Evidências sugerem que a variação das respostas de cada tecido está relacionada com sua capacidade metabólica, bem como o seu conteúdo de antioxidantes (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

As brânquias de moluscos bivalves requerem um sistema de defesa antioxidante eficaz, uma vez que está em contato contínuo com a água e eventuais xenobióticos e patogênicos, além de ser responsável pela transferência de oxigênio que ocorre sob sua superfície, podendo acumular EROs (DE-ZOYSA et al. 2011).

CAT é uma das enzimas antioxidantes clássicas e possui um papel fundamental na proteção celular, transformando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. Além disso, a CAT é essencial para o sistema imune inato dos invertebrados (ZHANG et al. 2011; WANG et al. 2013).

Apesar de ser o seu substrato, o acúmulo de H_2O_2 pode inibir a atividade desta enzima (VENKATESAN et al. 2006), bem como a exposição prolongada pode inibir a transcrição do gene (MIN; LIN; JUNG, 2010; QUAN; LIN; JUNG, 2011). Em experimento *in situ* no mesmo local poluído deste estudo, foi observada menor atividade da CAT em glândula digestiva de *C. gigas* (SOUZA et al. 2012).

Existem alguns estudos com a atividade de CAT e a identificação do gene para algumas espécies de moluscos, porém pesquisas sobre a transcrição do gene *CAT* relacionado com contaminantes ainda são raros. Uma classe de contaminantes capazes de promover a inibição da

transcrição da *CAT* em *Mytilus galloprovincialis* são os desreguladores endócrinos. Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a baixas concentrações de Bisfenol-A e uma mistura de desreguladores endócrinos apresentaram uma menor transcrição de *CAT* após 24 horas de tratamento (CANESI et al. 2007; CANESI et al. 2008).

Portanto, o menor nível de transcritos do gene da *CAT* no local BUC pode ser consequência de altos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular ou devido a presença de desreguladores endócrinos, afetando a modulação da transcrição gênica. Entretanto, essas hipóteses necessitam ser confirmadas por meio de experimentos que submetam as ostras a um estado de estresse oxidativo e experimentos com exposição a desreguladores endócrinos encontrados no esgoto sanitário (ex. 17 α - etinilestradiol).

As diferenças entre os tecidos analisados podem ter relação com a diferença na transcrição de *HSP70* entre brânquias e glândula digestiva, bem como no nível transcricional mais elevado observado para *FABP* e *GST-Q* em brânquias. A superfície de contato com os contaminantes, as afinidades desses poluentes por sítios de ligação específicos, diferentes taxas de acumulação e excreção podem influenciar a distribuição de contaminantes (YAP et al. 2008).

Neste contexto, as brânquias representam a primeira linha de contacto com os potenciais contaminantes (ALMEIDA et al., 2005). A interação das brânquias diretamente com o ambiente marinho, eleva os processos oxidativos neste tecido ao máximo refletindo as condições do ambiente aquático, enquanto que o complexo antioxidante na glândula digestiva pode variar também por fatores internos (ex. nutrição, reprodução) (SOLDATOV; GOSTYUKHINA; GOLOVINA, 2007). A fim de identificar a relação entre a resposta tecido-específica de biomarcadores em *C. gigas*, novos experimentos deverão ser realizados verificando a bioacumulação de contaminantes separadamente em cada tecido coletado.

Conclusões

Através deste estudo, pudemos verificar o impacto do esgoto sanitário na região, dado os resultados observados nas amostras de água, sedimento e bioacumulação pelas ostras *C. gigas* expostas por 14 dias nos locais de estudo. As ostras expostas no ambiente contaminado BUC

bioacumularam principalmente HPAs (11-81 vezes mais) e LABs (22-42 vezes mais).

O rio Bucheler, pequeno em seu curso de drenagem e grande contribuidor para a depreciação da qualidade das águas da região, passa a ser um local comprovativo da necessidade de serviços de saneamento em torno das baías de Florianópolis. O descaso com a coleta e o tratamento poderá inviabilizar atividades da indústria aquícola na região, principal fornecedora de ostras em mexilhões do Brasil. Os reflexos deste descaso já estão sendo observados no turismo, esportes náuticos e outras atividades de recreação.

As áreas de cultivo neste estudo apresentaram resultados considerados ausentes ou baixos para os níveis dos contaminantes analisados. Pesquisas que gerem informações sobre a qualidade ambiental nestas regiões se faz necessária frente ao risco em potencial promovido pelos efluentes urbanos para as atividades de maricultura.

Em relação aos biomarcadores moleculares utilizados no presente estudo, os genes *GST-Ω* e *FABP*, principalmente utilizando brânquias nas análises de qRT-PCR, mostraram-se como potenciais candidatos a biomarcadores moleculares em ostras expostas a esgoto sanitário, sendo validados pela primeira vez em campo. Os genes *HSP70* e *CAT* devem ser considerados em estudos futuros, bem como *GST-II* em estudos com esgoto sanitário e HPAs. Entretanto, é necessário estudos sobre a modulação destes genes em ostras *C. gigas*. O gene *CYP356A1*, inicialmente identificado em experimento de exposição ao esgoto sanitário sob condições controladas, não respondeu neste estudo *in situ*. Possivelmente as variações ambientais no campo (ex. regime de marés, ventos, salinidade, temperatura) podem estar influenciando no nível de transcrição deste gene em particular.

Este estudo é parte de uma exaustiva pesquisa de biomarcadores responsivos ao esgoto sanitário. O uso de iniciadores oriundos de bibliotecas subtrativas (SSH) de ostra *C. gigas* mostrou-se eficiente. Em trabalhos futuros será importante isolar os fatores (ex. LABs; HPAs: fenantreno, pireno, fluoranteno, reteno) e realizar experimentos em condições controladas de laboratório, buscando relacionar a transcrição de genes observados principalmente com os poluentes bioacumulados pelos animais durante a exposição a campo.

O esgoto sanitário por conter várias substâncias, a quantificação de diferentes xenobióticos que demonstrem seu impacto se faz necessária. Esta característica miscível e alta variabilidade quali-quantitativa torna a busca por biomarcadores sensíveis necessária para a

compreensão dos danos causados pelo esgoto sanitário em áreas urbanas costeiras.

Agradecimentos

Este experimento teve o apoio financeiro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA)/CNPq Projeto 578200/2008-2. FFN é bolsista de doutorado do CNPq (Processo 145331/2009-1). ACDB é bolsista de produtividade do CNPq. Os autores agradecem o LMM (UFSC), pela doação de ostras utilizadas neste trabalho.

Referências bibliográficas

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ALLEN, J. I.; MOORE, M. N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 227-232, 2004.

ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and resubmersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.318, p.21-30, 2005.

AL-SUBIAI, S. N. et al. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: an integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C(60) fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. **Mutation Research**, v. 745, n. 1-2, p. 92-103, 2012.

BAINY, A. C. D. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 411-416, 2000.

BAUDER, M. B.; PALACE, V. P.; HODSON, P. V. Is oxidative stress the mechanism of blue sac disease in retene-exposed trout larvae? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.24, p. 694–702, 2005.

BAUMARD, P. et al. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 47, n. 1, p. 77-90, 1998.

BAYEN, S.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. **Environmental Research**, v. 103, p. 375-382, 2007.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, p. 285-298, 2001.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.

BEYER, J. et al. Environmental harm assessment of a wastewater discharge from Hammerfest LNG: A study with biomarkers in mussels (*Mytilus* sp.) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1-2, p. 28-37, 2013.

BIERKENS, J., MAES, J., PLAETSE, V.F., Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollution. **Environmental Pollution**, v. 101, p. 91-97, 1998.

BILLIARD, S. M.; QUERBACH, K.; HODSON, P. V. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2070-2077, 1999.

BOEHM, P. 15 – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). **Environmental Forensics, Contaminant Specific Guide**, p. 313-337, 2005.

BOONYATUMANOND, R. et al. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 942-56, 2006.

BOULOUBASSI, I. et al. Carbon sources and cycle in the western Mediterranean - the use of molecular markers to determine the origin of organic matter. **Deep-Sea Research II**, v. 44, n. 34, p. 781-799, 1997.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p.147–157, 2004.

BRULLE, F. et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1441-1453. 2008.

BULTELE, F. et al. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 385-389, 2002.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science Of The Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CANESI, L. et al. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 276, n. 1-2, p. 36-44, 2007.

CANESI, L. et al. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 272-279, 2008.

CAPUZZO, J. M. The bioaccumulation and biological effects of lipophilic organic contaminants. In: KENNEDY, V.S., NEWELL, R.EX., EBLE, A.F. (Eds.), **The Eastern oyster: *Crassostrea virginica***. Maryland Sea Grant College: Silverspring, 1996. p. 539–557, 1996.

CARLETTI, E. et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2008.

CLARK, R. R. B. **Marine Pollution**, Oxford University Press. 236 p., 2001.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater**, 20a. Edição. American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Environment Federation, Washington, DC. 1998.

COLES, J. A.; FARLEY, S. R.; PIPE, R. K. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*, **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 367–379, 1994.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2005. Resolução Nº 357, 17 mar 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível no endereço: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

CREEL, L. Ripple effects : population and coastal regions. **Population Reference Bureau**. p. 2-8, 2003.

Canadian Shellfish Sanitation Program (CSSP), 2008. Disponível no endereço: <http://www.atl.ec.gc.ca/epb/sfish/cssp.html>

CULLITON, T. J. Population: Distribution, Density and Growth. **National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) State of the Coast Report**. Silver Spring, MD: NOAA. 1998. Disponível no endereço: http://oceanservice.noaa.gov/websites/retiredsites/sotc_pdf/POP.PDF

DE ZOYSA, M. et al. Transcriptional analysis of disk abalone (*Haliotis discus discus*) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 1, p. 155-60, 2011.
DHANANJAYAN, V.; MURALIDHARAN, S.; PETER, V. R. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment collected along the Harbour Line, Mumbai, India. **International Journal of Oceanography**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

DUMBAULD, B. R.; RUESINK, J. L.; RUMRILL, S. S. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. **Aquaculture**, v. 290, n. 3-4, p. 196-223, 2009.

ESTEVES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C**, v.142, p.262-74, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). **THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2006**. Rome, Italy, p. 180, 2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). **FAO FISHERIES AND AQUACULTURE TECHNICAL PAPER 500/1 - WORLD AQUACULTURE 2010**. Rome, Italy, p. 106, 2011.

FARRINGTON, J. W. et al. Hydrocarbons in cores of northwestern Atlantic coastal and continental margin sediments. **Estuarine and Coastal Marine Science**, v. 5, n. 6, p. 793–808, 1977.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FLEURY, E. et al. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. **BMC Genomics**, v. 10, p. 341, 2009.

FOWLER, B. A. Molecular biomarkers: Challenges and prospects for the future. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 97, 2005.

GAGNÉ, F. et al. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 2, p. 87-107, 2007.

GIULIANI, M. E. et al. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. **Aquatic Toxicology**, v. 134-135, p. 120-7, 2013.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile Sea Bass Liver Biotransformation and Erythrocytic Genotoxic Responses to Pulp Mill Contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 1, p. 104-112, 2002.

GRIMALT, J. O. et al. Assessment of Fecal Sterols and Ketones as Indicators of Urban Sewage Inputs to Coastal Waters. **Environmental Science and Technology**, v. 24, p. 357-363, 1990.

GUNTHER, A. J. et al. Long-term Bioaccumulation Monitoring with Transplanted Bivalves in the San Francisco Estuary. **Marine Pollution Bulletin** v. 38, p. 170-181, 1999.

GUPTA, S.C. et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? **Life Sciences**, v. 86, p. 377–384, 2010.

HALPERN, B. S. et al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948-952, 2008.

HANNAM, M. L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779-84, 2010.

HAWKINS, S. J. et al. Recovery of polluted ecosystems: the case for long-term studies. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 215-22, 2002.

HAWLICZEK, A et al. Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 213-23, abr. 2012.

HJORTH, M. et al. Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination. **Marine Ecology Progress Series**, v. 338, p. 21-31, 2007.

HODSON, P. V et al. Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 275-285, 2007.

HOGAN, N. S. et al. The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 3, p. 246-254, 2010.

HOARAU, P. et al. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 196-203, 2006.

HUNTER, C. L. et al. Contaminants in oysters in Kaneohe Bay, Hawaii. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, p. 646-654, 1995.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to

polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004.

ISOBE, K.O. et al. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography–mass spectroscopy to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 21, 4497–4507, 2002,

ISOBE, K. O. et al. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2448-58, 2004.

JEE, J. -H; KANG, J. -C. Biochemical changes of enzymatic defense system after phenanthrene exposure in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Physiological Research**, v. 54, p. 585-591, 2005.

JOA, K. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil shale processing wastes: current practice and new trends. **Oil Shale**, v. 26, n. 1, p. 59, 2009.

JU, Z. et al. 2006. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 145, n. 1, 134-144, 2006.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, 494 p., 1992.

KIM, M. et al. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 152, n. 2, p. 207-213, 2009.

KONINGS, A.W.; PENNINGA, P. On the importance of the level of glutathione and the activity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance. **International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine**, v.48, p. 409–422, 1985.

LAFLAMME, R. E.; HITES, R. A. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, p. 289-303, 1978.

LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 29, n. 4-5, p. 235-241, 1994.

LEEMING, R.; NICHOLS, P. D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2997-3006, 1996.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, n. 1-2, p. 137-47, 2009.

LÜCHMANN, K. H. et al. Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC**, v. 31, n. 6, p. 1249-53, 2012.

LUCHMANN, K. H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**. 2012. 178 f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

MACÍAS-ZAMORA, J. V.; RAMÍREZ-ALVAREZ, N. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 2, p. 229-238, 2004.

MACLEOD, W. D. et al. **Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility**, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. 2a. Edição, U.S. Department of Commerce, NOAA/NMFS Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121p., 1986.

MAI, B. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal region off Macao, China: assessment of input sources and transport pathways using compositional analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 21, p. 4855-63, 2003.

MAO, Y. et al. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, 2006.

MARIA, V. L.; CORREIA, A C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 2, p. 230-238, 2005.

MATOS, M. A. C. **Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SP. Brasil.** 2002. 200 f. (Tese de Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2002.

MEDEIROS, I.D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n.1, p. 156-157, 2008 (a).

MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362-365, 2008 (b).

MEDEIROS, P. M. et al. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. **Environment International**, v. 31, n. 1, p. 77-87, 2005.

MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP--Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 11-12, p. 892-899, 2004.

MIAO, J. et al. Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to benzo[a]pyrene exposure. **Marine Genomics**, v. 4, n. 2, p. 99-108, 2011.

MIN, J. Y.; LIM, S.-O.; JUNG, G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. **FEBS Letters**, v. 584, n. 11, p. 2427-2432, 2010.

MOORE, M. N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, v. 552, n. 1-2, p. 247-268, 2004.

MORALES, M. et al. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 150-158, 2011.

MUDGE, S. M.; NORRIS, C. E. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. **Marine Chemistry**, v. 57, n. 1-2, p. 61-84, 1997.

NICHOLS, P. D. et al. Comparison of the abundance of the fecal sterol coprostanol and fecal bacterial groups in inner-shelf waters and sediments near Sydney, Australia. **Journal of Chromatography**, v. 643, n. 1-2, p. 189-95, 1993.

NRC (National Research Council). **Oil in the sea, inputs, fates and effects**. p. 601. Washington D.C.: National Academy Press, 1985.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Chapter 17 - Molluscs as bioindicators. **Trace Metals and other Contaminants in the Environment, Bioindicators & Biomonitors — Principles, Concepts and Applications**, v. 6. p. 577-635, 2003.

OKAY, O. S.; TÜFEKÇİ, V.; DONKIN, P. Acute and chronic toxicity of pyrene to the unicellular marine alga *Phaeodactylum tricornutum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 600–605, 2002.

OKAY, O. S. et al. Effects of pyrene on mussels in different experimental conditions. **Environment International**, v. 32, n. 4, p. 538-44, 2006.

OLIVEIRA, M.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. **Ecological Indicators**, v. 19, p. 206-214, 2012.

PETERSEN, D. G.; REICHENBERG, F.; DAHLLÖF, I. Phototoxicity of pyrene affects benthic algae and bacteria from the Arctic. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 4, p. 1371-6, 15 2008.

PHILLIPS, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutation research**, v. 443, n. 1-2, p. 139-47, 1999.

PIANO, A. et al. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. **Gene**, v. 361, p. 119-26, 2005.

PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 2, p. 134-42, 2004.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

QUAN, X.; LIM, S.-O.; JUNG, G. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. **FEBS letters**, v. 585, n. 21, p. 3436-41, 2011.

RAND, G.M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis. 1125 p., 1995.

READMAN, J. W. et al. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 48-62, 2002.

RHEE, J.-S. et al. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 104-12, 2009.

RIDGWAY, J.; SHIMMIELD, G. Estuaries as Repositories of Historical Contamination and their Impact on Shelf Seas. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, n. 6, p. 903-928, 2002.

ROCHER, B. et al. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 1, p. 65-77, 2006.

RODRIGUES, A. P. et al. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: Accumulation and multibiomarker responses. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 454-463, 2013.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M.J. et al. Biochemical biomarkers os pollution on the clam *Chamaelea gallina* from south-spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 542-549, 2002.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14, 2006.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, n. 13, p. 2463-76, 2006.

SCHÄFER, S.; KÖHLER, A. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. **Marine Environmental Research**, v. 68, n. 3, p. 128-36, 2009.

SCHIRMER, K. et al. Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology**, v. 127, n. 1-3, p. 143-55, 1998.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCOTT, J. A et al. AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 165-74, 2011.

SCOTT, J. A; HODSON, P. V. Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and alpha-naphthoflavone. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 200-6, 2008.

SEKOVSKI, I.; NEWTON, A.; DENNISON, W. C. Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 96, p. 48-59, 2012.

SERICANO, J. L. et al. Trace Organic Contamination in the Americas : An Overview of the US National Status & Trends and the International 'Mussel Watch' Programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 95, p. 214-225, 1995.

SHAH, V. G. et al. Bacterial source tracking from diverse land use catchments by sterol ratios. **Water Research**, v. 41, n. 16, p. 3667-74, 2007.

SIEBERT, M.N. et al. Fatty-acid binding protein, a molecular biomarker of exposure to domestic sewage in pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In: **15 th**

International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, 2009, Bordeaux. Abstract Book, Bordeaux, 2009, p. 472.

SIRITANTIKORN, A. et al. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 2, p. 592-6, 2007.

SOLDATOV, A A; GOSTIUKHINA, O. L.; GOLOVINA, I. V. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 621-8, 2007.

SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 153-61, 2012.

STORCH, J.; THUMSER, A E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 1, p. 28-44, 2000.

SUN, Y. et al. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. **Chemosphere**, v. 63, n. 8, p. 1319-27, 2006.

TAKADA, H., ISHIWATARI, R., OGURA, N. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 35, p. 141-156, 1992.

TANIGUCHI, S. **Pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em bivalves ao longo da Costa Brasileira – International Mussel Watch**. 1995. 65 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1995.

TAVARES, T. M. et al. Application of the mussel watch concept in studies of hydrocarbons, PCBs and DDT in the Brazilian Bay of Todos os Santos (Bahia). **Marine Pollution Bulletin**, v. 19, n. 11, p. 575-578, 1988.

TAYLOR, D. A et al. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney

Rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 65-71, 2013.

TOLEDO-SILVA, G. **Análise da expressão gênica diferencial em ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ***. 2009. 98 f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TSUTSUMI, S. et al. Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 325-31, 2002.

UNEP (1992). **Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments**, Reference Methods for Marine Pollution studies 20, 77p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VELKOV, T. et al. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 44, n. 1, p. 23-31, 2005.

VENKATESAN, B. et al. Downregulation of Catalase by Reactive Oxygen Species Via PI 3 Kinase / Akt Signaling in Mesangial Cells. **Journal of Cellular Physiology**, p. 457-467, 2006.

VERRENGIA-GUERRERO, N. R. et al. Influence of particle characteristics and organic matter content on the bioavailability and bioaccumulation of pyrene by clams. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 1, p. 115-22, 2003.

VOLKMAN, J. K. et al. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **The Science of The Total Environment**, v. 112, n. 2-3, p. 203-219, 1992.

WALKER, S. E. et al. Molecular and isotopic identification of PAH sources in a highly industrialized urban estuary. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 4, p. 619-632, 2005.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, 2a edição, Londres, 309 p., 2001.

WANG, C. et al. cDNA cloning and mRNA expression of four glutathione S-transferase (GST) genes from *Mytilus galloprovincialis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 697-703, 2013.

WANG, Z. et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 4, p. 639-45, 2009.

WANG, C. et al. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 91-99, 2013.

WASHBURN, B.S. et al. Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 557–560, 2002.

WEINSTEIN, J. E. Fluoranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal field and laboratory studies. **Marine Environmental Research**, v. 43, n. 3, p. 201-218, 1997.

WEPENER, V. et al. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. **Physics and Chemistry of The Earth**, v. 30, n. 11-16, p. 751-761, 2005.

WERNER, I.; HINTON, D. E. Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? **Biomarkers**, v. 4, n. 6, 473-484, 1999.

WRITER, J. H. et al. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the fecal sterol, coprostanol. **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1427-1436, 1995.

XU, C. et al. Cloning, characterization and tissue distribution of a pi-class glutathione S-transferase from clam (*Venerupis philippinarum*): Response to benzo[alpha]pyrene exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 160-166, 2010.

YAP, C.K et al. Distribution of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Ni, Fe and Zn) in the different soft tissues and shells of wild mussels *Perna viridis* collected from bagan tiang and kuala kedah. *Malaysian Applied Biology Journal*, v. 37, n. 2, p. 1–10. 2008

YIN, Y. et al. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 288-93, 2007.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-8, 2008.

ZHANG, Y. et al. Two catalase homologs are involved in host protection against bacterial infection and oxidative stress in *Crassostrea hongkongensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 894-903, 2011.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.

ZHOU, R.; ZHU, L.; KONG, Q. Levels and distribution of organochlorine pesticides in shellfish from Qiantang River, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1192-1200, 2008.

CAPÍTULO III

EXPRESSÃO PROTEICA DE OSTRAS DO PACÍFICO *Crassostrea gigas* EXPOSTAS *IN SITU* A EFLUENTES COM ESGOTO SANITÁRIO, FLORIANÓPOLIS, SC

Fabício Flores-Nunes¹; Tânia Gomes²; Rui Company²; Roberta R. M. Moraes¹;
Silvio Sasaki³; Satie Taniguchi³; Márcia Bicego³; Cláudio M. R. Melo⁴; Afonso
C. D. Bainy¹; Maria J. Bebianno²

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

² Laboratório de Toxicologia e Química Ambiental, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve.

³ Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴ Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

*Este capítulo está sendo preparado para publicação no periódico Marine Environmental Research (Estrato A2 – Zootecnia/Recursos Pesqueiros).

Resumo

A composição e concentração das substâncias presentes em efluentes urbanos são bastante complexas e de difícil mensuração, contendo uma mistura de efluentes domésticos, hospitalares, de postos de combustíveis e de pequenas indústrias. Dentre os moluscos bivalves utilizados como organismos sentinela em programas de monitoramento, a ostra *Crassostrea gigas* ocupa uma posição de destaque, por ser a espécie de molusco marinho mais cultivado e consumido no mundo. Análises proteômicas são utilizadas como ferramentas de toxicologia ambiental, sendo complementares aos estudos genômicos. A proteômica, através da alteração da expressão de proteínas, propicia o desenvolvimento de novas ferramentas de biomonitoramento com maior relação com diferentes tipos de contaminantes ambientais. O objetivo do presente estudo foi comparar a expressão proteica em glândula digestiva de *C. gigas* expostas por 14 dias em ambiente de cultivo (LIS, RIB) com a expressão em ostras mantidas em local contaminado por esgoto sanitário (BUC) a fim identificar proteínas diferencialmente expressas nestas condições. O padrão de expressão de proteínas em glândula digestiva foi observado comparando o local contaminado com os locais de cultivo (BUCxLIS; BUCxRIB) utilizando a eletroforese bidimensional para identificar proteínas diferencialmente expressas. As proteínas identificadas estão relacionadas com citoesqueleto (CKAP5, ACT2), ubiquitinação e via de conjugação (UBE3C), receptor acoplado à proteína G e via de transdução de sinal (SVEP1) e ciclo celular/divisão celular (CCNB3). A proteína CKAP5 apresentou maior expressão nas ostras expostas no local contaminado, enquanto as proteínas ACT2, UBE3C, SVEP1, CCNB3 tiveram uma menor expressão nos mesmos animais em relação às áreas de cultivo. Os resultados sugerem que estas alterações poderão causar apoptose e interferências no sistema imune em ostras *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário. As proteínas ACT2, CKAP5, UBE3C, CCNB3 e SVEP1 devem ser melhor estudadas e consideradas em estudos futuros com ostras expostas ao esgoto sanitário. Este estudo poderá servir de base na identificação da assinatura de expressão proteica (PESs) para ostras *C. gigas* expostas a efluentes contendo esgoto sanitário como resposta global do impacto em ambientes costeiros urbanizados.

Palavras-chave: Esgoto sanitário, *Crassostrea gigas*, Análise proteômica, Eletroforese bidimensional, MALDI-TOF-TOF

PROTEIN EXPRESSION OF PACIFIC OYSTERS *Crassostrea gigas* EXPOSED *IN SITU* TO EFFLUENTS CONTAINING SANITARY SEWAGE, Florianópolis, SC

Abstract

The composition and concentration of substances in effluents are quite complex and difficult to measure; it can be a mixture of domestic sewage, hospitals, gas stations and small industries. Among the bivalve mollusks used as sentinel organisms in monitoring programs, the oyster *Crassostrea gigas* holds a prominent position, for being the kind of marine mollusk most cultivated and consumed over the world. Proteomic analysis can be used as tools in environmental toxicology, being complementary to genomic studies. The Proteomics reflects the alteration of protein expression by environmental adaptations, providing a useful framework for the development of new tools for biomonitoring more related to different types of contaminants by sanitary sewage. The aim of this study was to determine the protein expression in the digestive gland of oysters *C. gigas* that were exposed for 14 days to oysters aquaculture areas (LIS, RIB) compared with the expression of oysters maintained in polluted area with sanitary sewage (BUC) and identified differentially expressed proteins in those conditions. Proteins expression profiles in the digestive gland were observed comparing the polluted station with cultivation sites (BUCxLIS; BUCxRIB) using two-dimensional electrophoresis to identify differentially expressed proteins. The proteins in this study are related to the cytoskeleton (CKAP5, ACT2), and ubiquitination pathway conjugation (UBE3C), G protein-coupled receptor and signal transduction (SVEP1) and cell cycle/cell division (CCNB3). Among the identified proteins, protein CKAP5 has showed higher expression in oysters exposed in that polluted site by sewage in comparison to the areas of cultivation, while proteins ACT2, UBE3C, SVEP1, CCNB3 had a lower expression of the same animals. The results suggest that these changes might lead to DNA damage, apoptosis, and interference with the immune system in oysters *C. gigas* exposed to sewage. ACT2, CKAP5, UBE3C, CCNB3 and SVEP1 should be better studied and considered in future studies with oysters exposed to urban sewage. This preliminary study may serve as initial information on the configuration of protein expression signatures (PESS) for oysters *C. gigas* exposed to sewage as overall response to the impact in the urbanized coastal environment.

Keywords: Sanitary sewage, *Crassostrea gigas*, Proteomic analysis, Two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-TOF

Introdução

O esgoto sanitário é uma das principais fontes de contaminação nos ecossistemas marinhos e estuarinos, que causa efeitos adversos em organismos expostos e tecidos alvo, podendo refletir na alteração da estrutura das populações e comunidades (KENNISH, 1992; ABESSA et al., 2005; MARTINS et al., 2008).

O esgoto despejado na região costeira geralmente tem uma composição típica, com altos níveis de sólidos e nutrientes e baixas concentrações de metais-traço, hidrocarbonetos e pesticidas. Em alguns casos, o esgoto urbano ainda pode apresentar uma mistura de efluentes domésticos, hospitalares, de postos de combustíveis e de pequenas indústrias (ABESSA et al., 2005). Outras substâncias potencialmente poluidoras, denominadas contaminantes emergentes, estão presentes no esgoto sanitário oriundas de atividades domésticas comuns (higiene pessoal, produtos de limpeza, lavagem de roupas), descarte inadequado de medicamentos e outros resíduos humanos (USEPA, 2009). Detergentes, fármacos, produtos de uso pessoal e desreguladores endócrinos (hormônios naturais e sintéticos) vêm recebendo atenção quanto aos efeitos para a biota, bem como sua regulamentação para o descarte no ambiente aquático (BOLONG et al., 2009; USEPA, 2009).

A análise quali-quantitativa das substâncias presentes em efluentes urbanos, assim como seu risco para a biota, são bastante complexas e de difícil mensuração. Em geral, a composição de efluentes está relacionada a vários fatores como, por exemplo, o grau de desenvolvimento socioeconômico da região. A contaminação dos ecossistemas costeiros por esgoto é uma preocupação mundial, uma vez que cidades que não possuem coleta, tratamento e despejos adequados para o esgoto, apresentam um maior risco de contaminação microbiológica e química.

Muitos estudos ecotoxicológicos em ambientes marinhos e estuarinos utilizam moluscos bivalves como organismos sentinela por apresentarem uma ampla distribuição geográfica, serem filtradores, sésseis, eurialinos, espécies dominantes em seu habitat, e apresentarem uma grande capacidade em acumular contaminantes (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; BEEBY, 2001; CHEUNG et al., 2002; CHEUNG et al., 2001; LAU; WONG, 2003). Dentre os moluscos bivalves, a ostra *Crassostrea gigas* ocupa uma posição de destaque, por ser a espécie de molusco marinho mais cultivado, consumido e estudado no mundo (MAO et al., 2006; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). No

Brasil, 95% da produção de moluscos marinhos provenientes da aquicultura estão localizados na região Sul, especialmente no estado de Santa Catarina que contribui com mais de 93% desta produção (BOSCARDIN, 2008). As baías da Grande Florianópolis são responsáveis pela produção de mais de 70% dos moluscos catarinenses, sendo 96,1% referentes à espécie *C. gigas* (EPAGRI, 2013) o que aponta para o potencial desta espécie para o monitoramento de regiões de cultivo.

As alterações decorrentes da exposição aos contaminantes nos organismos a nível molecular, bioquímico, fisiológico, histológico ou celular são denominadas biomarcadores (HUGGETT et al., 1992). Em ambientes poluídos pode ocorrer o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), e neste caso, os organismos necessitam aumentar suas defesas antioxidantes a fim de manter a homeostase celular evitando os efeitos nocivos causados por estes contaminantes. Estas defesas estão presentes em todos os organismos aeróbicos, uma vez que as EROs são produzidas no processo de fosforilação oxidativa para obtenção de energia, ação fagocitária de leucócitos, atividade de enzimas, entre outras (DI GIULIO et al., 1989; STOREY, 1996). A exposição a xenobióticos pode causar um desequilíbrio da homeostase, promovendo uma série de modificações covalentes reversíveis e irreversíveis nos aminoácidos podendo levar à inativação das proteínas, além de processos mutagênicos e carcinogênicos (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992; GHEZZI; BONETTO, 2003; McDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005).

De um modo geral, os contaminantes podem atuar como efetores que ativam sensores ou receptores celulares, que por sua vez interagem com sequências específicas de DNA no núcleo promovendo a transcrição de múltiplos genes. O RNA mensageiro (RNAm) é processado e enviado ao citoplasma para que ocorra a síntese de proteínas, constituindo portanto a resposta celular (PINA; CASADO; QUIROS, 2007). Portanto, técnicas genômicas e proteômicas são ferramentas importantes para avaliação do perfil global de resposta molecular/biológica dos animais expostos que podem auxiliar tanto no desenvolvimento da ostreicultura (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006), como em programas de avaliação de risco ecológico (KLING et al. 2008). Embora a informação armazenada no DNA possa ser usada para prever os processos biológicos, as proteínas são os executores finais dos vários programas de resposta celular (RUDERT; GE; ILAG, 2000).

Proteômica é definida como o estudo das proteínas expressas por um genoma ou tecido, refletindo a alteração desta expressão por adaptações ambientais induzidas por poluentes e processos patológicos (MOORE, 2002; LÓPEZ, 2005). Esta técnica propicia o desenvolvimento de novas ferramentas de biomonitoramento com maior relação com diferentes tipos de contaminantes ambientais (THOMPSON et al. 2012a). Análises proteômicas vêm sendo utilizadas como ferramentas em estudos de toxicologia ambiental, complementando estudos genômicos (PANDEY; MANN, 2000; LÓPEZ, 2005; JONSSON et al., 2006). Avanços na separação de proteínas, ionização de peptídeos e metodologias de identificação têm ampliado o uso da proteômica para aplicação em um grande número de organismos sentinela (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012).

Devido às características sésseis dos bivalves, a pesquisa proteômica pode proporcionar uma melhor correlação entre o estresse analisado e a toxicidade dos poluentes (CAMPOS et al. 2012). Neste sentido, a utilização de proteínas como biomarcadores vem sendo aplicada para moluscos de cultivo (LÓPEZ et al. 2002) e para avaliar diferentes impactos ambientais, como algas tóxicas (RONZITTI et al., 2008), infecções por protozoários (CAO et al. 2009), contaminantes orgânicos (OLSSON et al. 2004; JONSSON et al., 2006; MONSINJON et al. 2006; APRAIZ; CAJARAVILLE; CRISTOBAL, 2009), efluentes urbanos (AMELINA et al. 2007), metais-traço (SHEPARD; BRADLEY, 2000; CHORA et al. 2008; CHORA et al. 2009; THOMPSON et al. 2012a) e nano partículas (GOMES et al. 2013). Proteínas relacionadas com metabolismo energético, citoesqueleto, estabilização proteica e *turnover*, estresse oxidativo e sinalização, são respostas comuns às mudanças ambientais (TOMANEK, 2011). A identificação de proteínas que são induzidas ou reprimidas nos permite propor mecanismos moleculares de resposta ao agente estressor (NESATYY; SUTER, 2007).

Várias metodologias vêm sendo aplicadas às análises proteômicas, porém a eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (*two-dimensional gel electrophoresis* – 2DE) é a ferramenta mais estabelecida e utilizada (LEMOSS et al. 2010). A comparação destes géis, visualizando proteínas expressas e/ou inibidas simultaneamente é uma das formas de identificar a relação do agente estressor. Estes “mapas proteômicos” também podem ser chamados os perfis de expressão proteica (PEPs – *Protein Expression Profiles*).

Os PEPs podem ser utilizados como uma tela onde um padrão de expressão pode ser identificado, porém não estão diretamente relacionados com um único agente estressor. A comparação destes PEPs de grupos expostos diferentemente à xenobióticos (e. g. tratado x controle) pode fornecer um padrão de resposta e são chamados de assinaturas de expressão proteica (PESs – *Protein Expression Signatures*). As PESs são grupos de proteínas específicas expressas diferencialmente, refletindo uma resposta frente a algum desafio (BRADLEY et al. 2002). Através destas assinaturas é possível selecionar proteínas que podem estar diretamente relacionadas com o agente estressor, bem como reconhecer possíveis interações proteína-proteína (RUDERT; GE; ILAG, 2000). O desenvolvimento do PES como ferramenta em programas de monitoramento ambiental pode ser utilizado como uma estratégia mais acessível de avaliação, não exigindo necessariamente a identificação das proteínas (SHEPARD et al. 2000; APRAIZ; CAJARAVILLE; CRISTOBAL, 2009).

O objetivo deste estudo é foi avaliar a expressão proteica em glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário, identificando proteínas diferencialmente expressas.

Metodologia

Coleta e exposição dos animais

Ostras *C. gigas* (6-8 cm) coletadas na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na Praia de Sambaqui (SAM; Florianópolis, SC) foram transplantadas para duas áreas de cultivo de moluscos (LIS: praia de Santo Antônio de Lisboa - Baía Norte; RIB: praia do Ribeirão da Ilha – Baía Sul) e para uma área contaminada por esgoto sanitário e utilizada neste experimento como controle positivo (BÜC: rio Bücheler) (Figura 1).

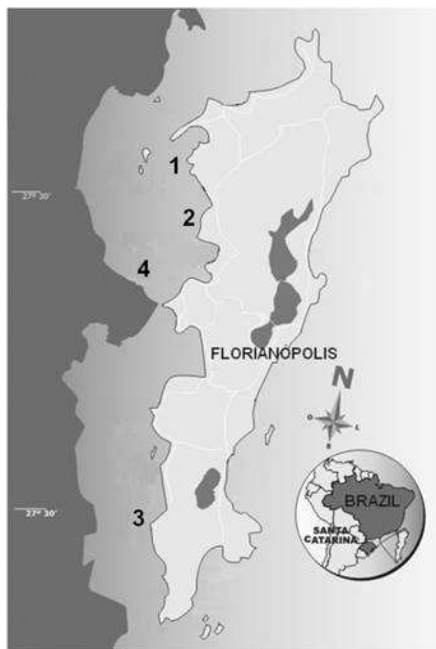


Figura 1 - Locais de estudo utilizados para o transplante das ostras na região das baías da Grande Florianópolis. 1-SAM: Sambaqui - LMM/UFSC (origem das ostras); 2- LIS: Santo Antônio de Lisboa; 3- RIB: Ribeirão da Ilha; 4- BUC: Rio Bücheler.

As ostras *C. gigas* (n=100) foram expostas a fim de comparar a expressão proteica frente aos contaminantes acumulados nos tecidos das ostras expostas. Após 14 dias de exposição, as ostras foram coletadas em cada local de estudo (n=10), dissecadas as glândulas digestivas de cada animal, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C. Amostras de água superficial de cada local foram coletadas para análises de coliformes fecais, detergentes, matéria orgânica e óleos e graxas foram coletadas (início do experimento, 24h após exposição e ao final do estudo – 14d). Para a avaliação da bioacumulação e contaminação dos locais de exposição, um *pool* de ostras inteiras (n=8) e cerca de 250g de sedimento (draga Petit Ponar modificada) foram coletados em cada local ao final do experimento (14d), respectivamente.

Análises proteômicas

O preparo das amostras, bem como o protocolo utilizado para a realização da eletroforese bidimensional foi realizado de acordo com Chora et al., 2009.

Para cada local de monitoramento (LIS, RIB e BÜC), foram preparados cinco “pools”, utilizando em cada um deles uma parte da glândula digestiva de dois animais (n=5). Os tecidos foram pesados (~200 mg, sendo 100 mg de cada animal), suspensos em tampão específico (HEPES 10 mM e 250 mM de solução de sacarose contendo 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 10% de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* P8340 Sigma) e homogeneizados usando um homogeneizador Ultra-Turrax IKA-Werke num banho de gelo a 4°C na proporção de 3:1 (tampão: tecido). O homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 2h e o sobrenadante foi estocado em freezer -80 °C para posterior utilização. A quantificação da proteína total foi determinada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). Alíquotas com 300 µg de proteína foram suspensas em solução de precipitação (1:9, 10% de ácido tricloroacético em acetona fria contendo 20 mM de DTT) durante 2 h a -20 °C, centrifugado a 10.000 x g durante 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* precipitado foi lavado três vezes com acetona fria. A acetona residual foi removida por secagem ao ar.

Electroforese bidimensional (2DE)

As proteínas foram primeiramente separadas pelo seu ponto isoeletrico (primeira dimensão) através da focalização isoeletrica (IEF), seguida de separação por peso molecular por eletroforese bidimensional (2-DE).

Cada amostra contendo 300 µg de proteína foi incubada durante 30 min em 300 µL de tampão de lise (uréia 7 M, 2 M tiouréia, CHAPS 4%, formalito 0,8%, 65 mM DTT e traços de azul de bromofenol). Após dissolução, o volume foi centrifugado (14.000 x g, 10 min, 4 °C) e aplicado ao longo dos *strips* (Immobiline DryStrip GE - pH 4-7, 18 cm).

Após 6h de reidratação passiva seguida de 6h de reidratação ativa (50 V), a IEF foi realizada (20°C, 50A por *strip*) no aparelho Protean® IEF Cell (BioRad, CA, USA) usando um programa de cinco passos:

1000V por 1h; 4000V por 1h; 8000V por 1h e 8000V por 5h, para atingir um total de 50.000 Vh. Após a IEF, os *strips* foram congelados a -80°C .

Antes de realizar a eletroforese bidimensional, os *strips* foram equilibrados em tampão 6 M ureia, 75 mM de Tris, pH 8,8, SDS 4%, glicerol 29,3% contendo DTT 2% durante 15 min seguido de mais 15 min no tampão contendo iodoacetamida 2,5%. A eletroforese bidimensional (2-DE SDS-PAGE) foi realizada em géis de poliacrilamida 10% utilizando o Protean® Cell XL Cell Format (BioRad, CA, USA) em sistema vertical (20°C), em duas etapas: 90V por 30 min para uma gradual passagem da amostra para o topo do gel e 300V até a amostra percorrer todo o gel (aprox. 6h).

Ao término, os géis foram corados com prata obedecendo um protocolo compatível com a análise de espectrometria de massa (BLUM; BIERE; GROSS, 1987). Para assegurar a reprodutibilidade, seis géis de cada condição foram preparados, sendo os quatro melhores utilizados para a análise de imagem.

Aquisição e análise de imagem

Após coloração, os géis foram digitalizados em densitômetro (GS-800, BioRad, CA, USA) e as proteínas (*spots*) presentes no gel foram quantificadas e normalizadas. A análise dos dados e o tratamento estatístico foram realizados utilizando o software PDQuest 8.0 (BioRad, CA, USA). Um gel mestre foi construído através da combinação dos mapas 2-DE (géis; em tetraplica) como controle positivo. Os mapas 2-DE de glândula digestiva das ostras de cultivo (LIS e RIB) foram sobrepostos com o mapa de referência 2-DE do local contaminado (BÜC).

Para possibilitar uma comparação precisa da intensidade dos *spots* nos diferentes géis, foi realizada uma normalização, onde o valor do volume de cada *spot* protéico foi dividido pelo volume total de todos os *spots* detectados na imagem. Volumes normalizados foram comparados com os valores correspondentes do gel de referência (calibração). O número de *spots* válidos foi determinado para cada gel, bem como o número de proteínas correspondentes, e as diferenças qualitativas e quantitativas nos padrões de proteínas entre os locais de cultivo e poluído foram determinados.

Neste estudo, *spots* com uma expressão maior ou menor do que duas vezes (sobrexpressas e subexpressas, respectivamente) quando comparadas com o grupo controle. Os *spots* então presentes apenas no grupo controle positivo foram anotados.

Digestão dos *spots* e identificação das proteínas por espectrometria de massa

Proteínas da glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas *in situ* ao esgoto sanitário com as maiores alterações em expressão foram retiradas manualmente de géis corados com prata e digeridas com tripsina (SHEVCHENKO et al., 2006). As proteínas foram submetidas à identificação dos peptídeos por “*Peptide Mass Fingerprint*” (PMF) e os espectros de massa foram adquiridos utilizando um Ultraflex II MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics) operando com polaridade positiva no modo de reflexão e os espectros foram adquiridos na gama de m/z 900-3500.

Um total de 3000 espectros foi obtido em cada posição de ponto com uma frequência de 50 Hz a laser. Para as experiências MS/MS, íons de peptídeos com uma S/N superior a 25 e um pico de intensidade maior do que 800 foram selecionados para MS/MS. Disparos de laser (300 e 1000) foram usados para adquirir as experiências MS e MS/MS, respectivamente. A potência do laser foi de 2-5% acima do limiar de ionização.

A aquisição e o processamento de dados foi realizada com o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics), com o algoritmo de detecção de pico SNAP. A lista massa peptídeo obtido foi enviada para o software MASCOT usando o banco de dados do NCBI. Pesquisas foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: taxonomia: outros metazoários; enzima proteolítica: tripsina; peptídeos de tolerância: 100 ppm; modificações fixadas: carbamidometil (C), a modificação variável, a oxidação (M), estado responsável peptídeo: +1, clivagens perdidas permitidas: até 1. O limite de significância foi estabelecido a um nível mínimo de 95%.

Pesquisas MS BLAST (NCBI/Blastp) foram realizadas em banco de dados de proteínas não redundantes para as sequências disponíveis para *C. gigas* (taxid: 29159), utilizando o algoritmo BLAST proteína-proteína (parâmetros padrão).

Análises de coliformes fecais, detergentes, matéria orgânica, óleos e graxas.

Amostras de água superficial foram coletadas no início da exposição, após 24 de exposição e após 14 dias de exposição foram utilizadas para a realização de análises de bactérias termotolerantes (coliformes fecais, CF), detergentes (DTG), matéria orgânica (MO) e óleos e graxas (O/G) de acordo com protocolos padronizados (CLESCERI; GREENBERG; EATON, 1998).

Análise de contaminantes orgânicos

Amostras de sedimento (250 g) e de ostras (n=5) foram coletadas em cada local de exposição ao final do experimento (14d) para análise de contaminantes orgânicos. Estas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (LQO-IO-USP). Metodologia citada no Cap. II desta tese.

Bioacumulação de contaminantes orgânicos em *Crassostrea gigas*

O procedimento metodológico foi baseado em MacLeod et al. (1986) com algumas modificações.

Um grama de cada uma das amostras foi extraído com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em soxhlet durante 8 horas. Antes da extração foram adicionados 100 µL dos padrões surrogate com diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. Para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram adicionados naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂ (5 ng.µL⁻¹); para os bifenilos policlorados (BPCs) e pesticidas organoclorados foram utilizados o PCB-103 e PCB-198 (1 ng.µL⁻¹); o padrão interno dos alquilbenzeno lineares (LABs) foi o dodecil alquilbenzeno (1C₁₂LAB, 5 ng.µL⁻¹).

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 grama de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para

purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e adicionados os padrões internos (benzo(b)fluoranteno- d_{12} para HPAs, TCMX para BPCs e pesticidas e $1C_{19}$ LAB para os LABs). As amostras foram avolumadas 1 mL.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) da Agilent Technologies para análise de pesticidas organoclorados. Os demais grupos de compostos (HPAs, BPCs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies.

A identificação dos pesticidas, PAHs, PCBs e LABs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA e Fluka, Suíça. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados também através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z) ou. A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Análises de contaminantes no sedimento

Uma alíquota de 20 g foi extraída em sistema Soxhlet para análise dos BPCs, pesticidas organoclorados, esteroides (OIs), hidrocarbonetos alifáticos (HAs), HPAs e LABs com n-hexano/diclorometano 50% (v/v) segundo método descrito em UNEP (1992) e Matos (2002).

Antes da extração foram adicionados os padrões surrogate PCB-103, PCB-198, 5α -androstanol, naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , dodecil alquilbenzeno ($1C_{12}$ LAB), hexadeceno e eicoseno em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM). O SRM 1941 e SRM 1944 utilizados foram provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA).

O extrato foi dividido em duas alíquotas para serem submetidas à cromatografia por adsorção em coluna. A fração 1 foi eluída com 20 mL da mistura n-hexano/diclorometano (30%) em coluna contendo 3,2 g de

alumina 5% desativada para análise de organoclorados, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, LABs. A segunda fração foi eluída com 20 mL de diclorometano/metanol (50%) para a análise de esteroides.

Antes da injeção das frações foram adicionados padrões internos nas amostras avolumadas a 1 mL: TCMX, 5 α -colestano, benzo(b) fluoranteno d12, nonadecil alquilbenzeno (1-C₁₉LAB) e tetradeceno.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás 6890 da Agilent Technologies equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) para análise de pesticidas organoclorados e com detector de ionização de chama (GC-FID) 6890 para análise de HAs. Os demais grupos de compostos (HPAs, PCBs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N também da Agilent Technologies. A aquisição dos dados foi feita em SIM (single ion monitoring).

Os esteróides da fração 2 foram submetidos à derivatização, com o objetivo de transformá-los em compostos com menor ponto de ebulição, utilizando BSTFA [bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida] + 1% TMCS (trimetilclorosilano) em banho maria por 90 minutos a 65° C. A identificação e quantificação foi feita em GC-FID e a confirmação em GC/MS, modo SCAN.

A identificação dos pesticidas, HAs, HPAs, BPCs, LABs e esteróides foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard e Supelco dos EUA, Fluka da Suíça e Sigma-Aldrich da Alemanha. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através da razão massa/carga (m/z). A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Análises estatísticas

Os dados foram comparados utilizando-se testes não paramétricos (Mann-Whitney *U*-rank). Ao final das análises, os dados de qualidade de água e os contaminantes foram submetidos à Análise de Componente Principal (PCA – Principal Components Analysis). Para avaliar a existência de interação entre as proteínas expressas/ inibidas (dados bióticos) e contaminantes (dados abióticos) foi realizada uma Análise Canônica de Correspondência (CCA). Os resultados foram analisados

utilizando o programa GraphPad Prism® 5.01 e *XLSTAT* (Excel Windows).

Resultados

Os PEPs foram obtidos em amostras de glândula digestiva de *C. gigas* expostas a efluentes contendo resíduos de esgoto sanitário em comparação com ostras expostas em áreas destinadas ao cultivo de moluscos (BUCxLIS; BUCxRIB). Os géis apresentaram em média de 525 ± 24 spots por gel, num total de aproximadamente 1000 proteínas detectadas em todos os géis.

Dos spots observados, 118 ± 18 são exclusivos das amostras coletadas no local contaminado, não sendo encontrados nos PEPs dos locais de cultivo. Ostras oriundas de LIS e RIB apresentaram 70 e 101 proteínas específicas, respectivamente (Tabela 1). Quando comparados os valores dos animais expostos nos locais de cultivo com o local contaminado foram identificados 257 e 280 spots estatisticamente diferentes, respectivamente nos grupos comparados BUCxLIS e BUCxRIBs ($p < 0,05$). Destes, 109 spots eram comuns entre os dois experimentos (Figura 2).

Tabela 3 - Quantidade de spots (proteínas) por gel em cada experimento realizado (poluído x cultivo).

Local/Experimento	Média de spots por gel	Proteínas apenas no local	Proteínas ($p < 0,05$)	Proteínas de interesse	
				↓	↑
BUC vs. LIS	539	131	257	51	74
Proteínas comuns entre os dois experimentos	489	70	109	13	17
BUC vs. RIB	539	106	280	74	49
	534	101			

Legenda: BUC: foz do rio Bucheler (local contaminado); LIS: praia de Santo Antônio de Lisboa (baía Norte – cultivo); RIB: praia do Ribeirão da Ilha (baía Sul – cultivo). Nível de expressão menor que 2x (↓); Nível de expressão maior que 2x (↑).

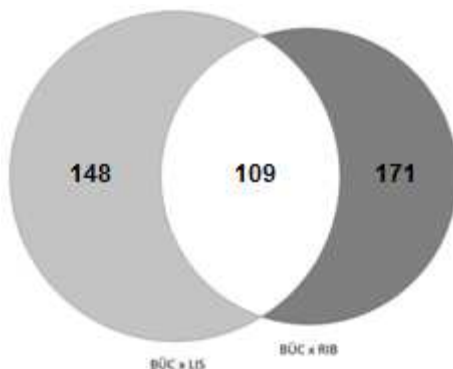


Figura 2 - Diagrama de Venn com a interação entre os PEPs de cada local de estudo. Spots encontrados apenas no ponto contaminado e em comum entre os dois experimentos ($p < 0,05$).

Os PEPs dos animais do local contaminado foram comparados com os PEPs dos animais das áreas de cultivo (BUCxLIS e BUCxRIB) para identificar assinaturas de expressão proteica (PESs). Entre os 131 *spots* reconhecidos nos animais de LIS e 106 dos animais de RIB, 57 *spots* eram coincidentes, sinalizando eventuais PES em comum entre os animais de cultivo (Figura 3).

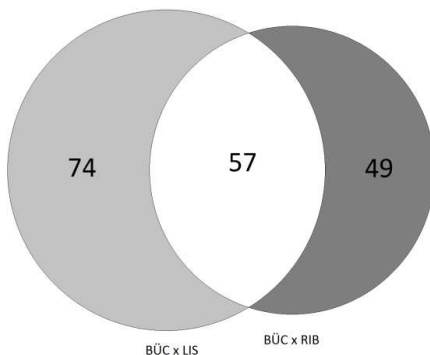


Figura 3 - Diagrama de Venn com spots específicos de cada tratamento (poluído x cultivo) e em comum entre eles ($p < 0,05$).

Ao final, foram identificados 30 *spots* de interesse e em comum entre os tratamentos, com intensidade nos géis do controle positivo em duas vezes maior ou menor quando comparado com os PEPs de cada região de cultivo. Deste total, 13 *spots* diminuíram duas vezes ou mais

de intensidade (*spots* -2x) e 17 *spots* aumentaram duas vezes ou mais de intensidade (*spots* +2x) (Figuras 4a e 4b).

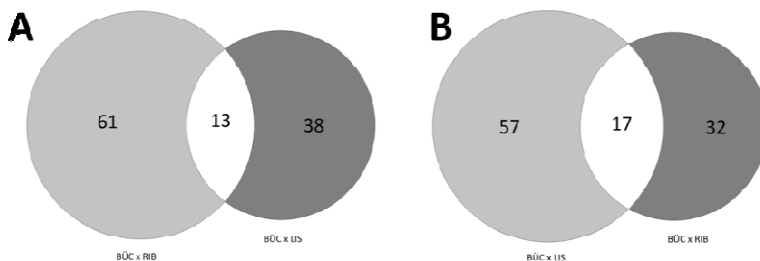


Figura 4 - Diagrama de Venn com spots de interesse relacionados com as proteínas expressas em menor quantidade (A) e em maior quantidade (B) em comum entre os experimentos (BÜC x RIB e BÜC x LIS).

Os *spots* foram selecionados por corte manual de acordo com sua localização identificada no gel mestre gerado pelo software PDQuest (Figuras 5 e 6). Os *spots* foram organizados quanto ao número identificado pelo software utilizado, bem como o pI (ponto isoelétrico) e peso molecular (M_r – *Molecular range*) observados, da mesma forma a expressão das proteínas (*spots* +2x; *spots* -2x) (Tabela 2).

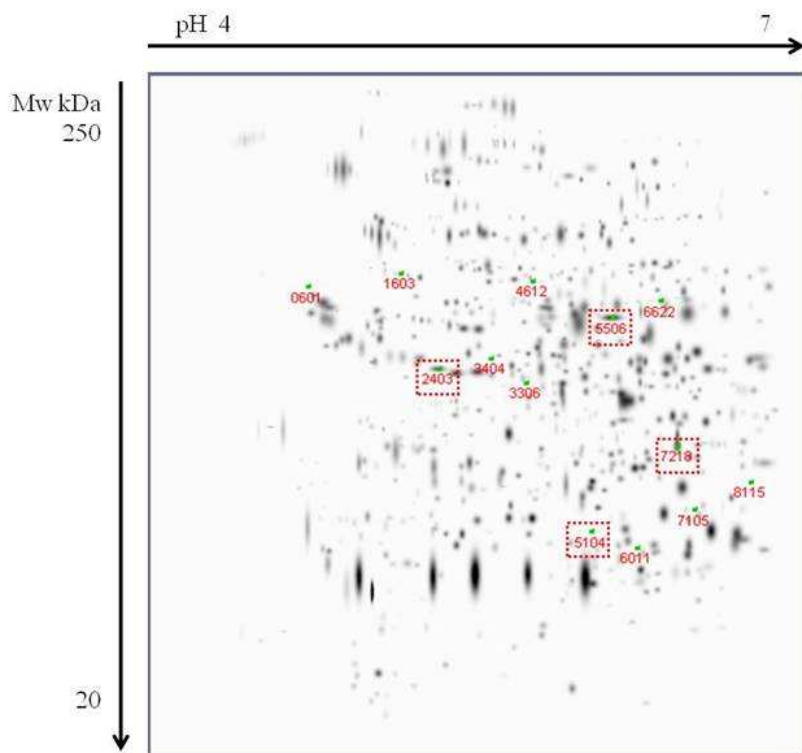


Figura 5 - Gel mestre representativo da assinatura de expressão proteica (PESs) com a localização das proteínas expressas em menor quantidade -2x ($p < 0,05$).

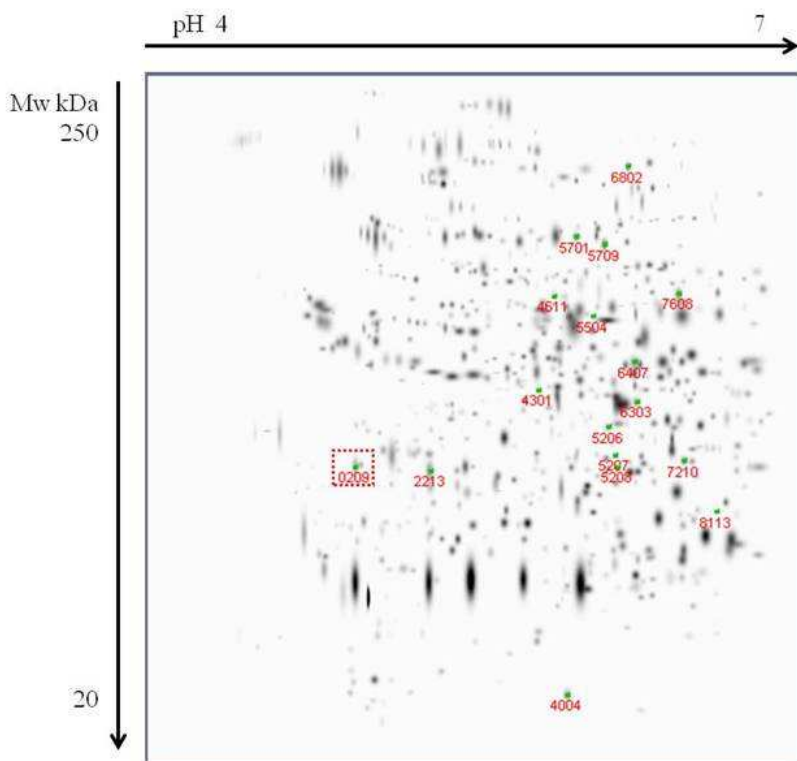


Figura 6 - Gel mestre representativo da assinatura de expressão proteica (PESs) com a localização das proteínas expressas em maior quantidade +2x ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Relação dos spots selecionados para sequenciamento. pI (ponto isoelétrico), Mr (peso molecular) e expressão (spots +2: ↑; spots -2x: ↓).

Spot n°	pI (Obs)	Mr (kDa) (Obs)	Expressão
209	4,89	34,42	↑
2213	5,20	34,03	↑
4004	5,92	19,35	↑
4301	5,75	40,72	↑
4611	5,83	57,68	↑
5206	6,12	37,67	↑
5207	6,16	35,67	↑
5208	6,17	34,43	↑
5504	6,03	53,12	↑
5701	5,96	73,39	↑
5709	6,10	71,14	↑
6303	6,28	39,71	↑
6407	6,26	44,54	↑
6802	6,23	110,47	↑
7210	6,50	35,09	↑
7608	6,48	58,28	↑
8113	6,66	30,03	↑
601	4,64	59,34	↓
1603	5,03	62,75	↓
2403	5,20	42,70	↓
3306	5,68	41,06	↓
3404	5,45	44,71	↓
4612	5,72	60,84	↓
5104	6,00	27,92	↓
5506	6,11	52,33	↓
6011	6,25	26,63	↓
6622	6,38	56,10	↓
7105	6,50	29,80	↓
7218	6,46	36,23	↓
8115	6,81	32,42	↓

A fim de verificar a relação entre os *spots* selecionados dos géis das ostras mantidas nos diferentes locais, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) com os valores de cada *spot* em

tetraplicata. A análise da lista de proteínas com maior e menor expressão demonstra diferenças entre os animais oriundos do local contaminado (BUC) e das áreas de cultivo de moluscos (RIB e LIS). Os resultados reforçam a qualidade dos géis selecionados para a análise da imagem e seleção dos *spots* de interesse. (Figuras 7 e 8).

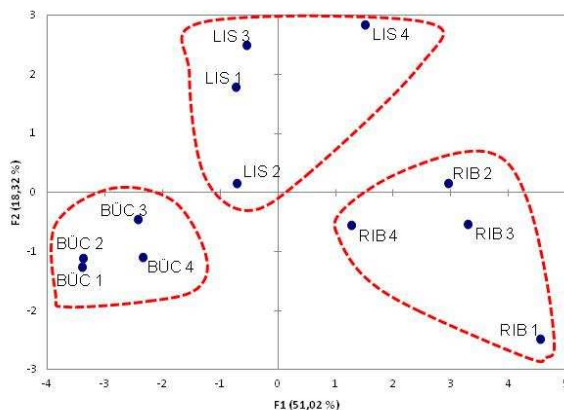


Figura 7 - Análise de componentes principais com spots relativos às proteínas expressas em menor quantidade nas ostras mantidas nos locais contaminados (géis em tetraplicata). BUC: local poluído; LIS: cultivo; RIB: cultivo.

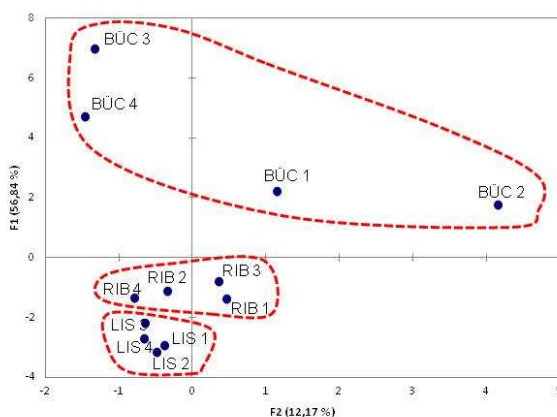


Figura 8 - Análise de componentes principais com os spots relativos às proteínas expressas em maior quantidade nos animais mantidos no local contaminado (géis em tetraplicata). BUC: local poluído; LIS: cultivo; RIB: cultivo.

Identificação das proteínas

Dos *spots* selecionados e encaminhados para sequenciamento por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF (PMF) foram identificadas seis proteínas, sendo que uma era constituída da actina que foi selecionada para sequenciamento a fim de verificar a correspondência com a posição da actina em mexilhões (localização do *spot*, Mr e pI conhecidos).

Dos 30 *spots* encaminhados para sequenciamento, cinco deles apresentaram homologia com proteínas identificadas e disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As proteínas sequenciadas estão relacionadas com citoesqueleto (CKAP5, ACT2), ubiquitinação/via de conjugação (UBE3C), receptor acoplado à proteína G/via de transdução de sinal (SVEP1) e ciclo celular/divisão celular (CCNB3) (Tabela 3).

Tabela 5 - Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF de proteínas diferencialmente expressas em ostras *C. gigas* exposta ao esgoto sanitário.

Spot n ^o	Nome	PDQuest Média ^b	Número de acesso	Mr (kDa)/pI teórico	Identificação da Proteína MALDI-TOF-TOF			Função
					Score ^c	% Cobertura	Peptídeos correspondentes	
209	Cytoskeleton-associated protein 5 (CKAP5)	13/2 ↑	gil405971153	199,7/ 8,73	1041	99	14	Citoesqueleto
2403	Actin 2 (ACT2)	2/3 ↓	gil18565105	41,7/5,3	702	100	10	Citoesqueleto
5104	Ubiquitin-protein ligase E3C (UBE3C)	4/8 ↓	gil405973722	122,8/ 8,46	807	94	5	Ubiquitinação/via de conjugação
5506	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1 (SVEP1)	2/5 ↓	gil405978218	102,5/ 5,88	1041	99	10	Receptor acoplado à proteína G/ Via de transdução de sinal
7218	G2/mitotic-specific cyclin B3 (CCNB3)	2/5 ↓	gil405974932	48,6/ 6,86	318	51	5	Ciclo celular/Divisão celular
-	Actin	-	gil3182893	41,7/5,3	759	100	10	Citoesqueleto

^a Número do *spot* nos mapas gel mestre gel 2DE (Figure 5 e 6).
^b Alteração no aumento (↑) ou diminuição (↓) em termos de intensidade entre as ostras expostas para BUCxLIS and BUCxRIB. Relação média calculada pelo PDQuest usando quatro réplicas em cada grupo. Para todas as comparações o valor $p < 0,05$.
^c Escores dos resultados usando MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) e NCBI/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), percentual de cobertura e o número de peptídeos correspondentes nas proteínas identificadas.

Contaminantes – Qualidade de água

Todos os parâmetros analisados nas amostras de água coletadas durante o experimento (início, 24h e 14d) demonstraram a contaminação no BUC (Tabela 4). As concentrações de CF no BUC atingiram níveis

de 1.100, 80.000 e 80.000 NMP por 100 ml, respectivamente nestes três períodos (Figura 9). Da mesma forma os valores mais elevados para DTG, MO e O/G foram encontrados no local contaminado em todos os tempos de exposição (Figura 9).

Tabela 6 - Resultados médios da análise das amostras de água coletadas durante o experimento de exposição.

Locais	CF (NMP/100ml)	DTG (mg LAS/L)	MO (mg/L)	O/G (mg/L)	Água T °C (°C)
SAM	0,00	< LDM	< LDM	< LDM	19,10
LIS	20,00	< LDM	< LDM	< LDM	18,17
RIB	80,00	< LDM	< LDM	< LDM	18,00
BÜC	53700,00	0,59	2,92	15,74	18,67

CF: coliformes fecais; DTG: detergentes; MO: matéria orgânica; O/G: Óleos e Graxas; Água T°C: temperatura da água. Os valores pra SAM são absolutos (apenas uma coleta no T0h) e os demais pontos correspondem à média do início da exposição (T0h), 24h e 14 dias de exposição. <LDM: abaixo do limite de detecção do método. SAM: praia do Sambaqui (origem das ostras – T0h); LIS: Santo Antônio de Lisboa – Cultivo Baía Norte; RIB: Ribeirão da Ilha – Cultivo Baía Sul; BUC: rio Bücheler – Poluído.

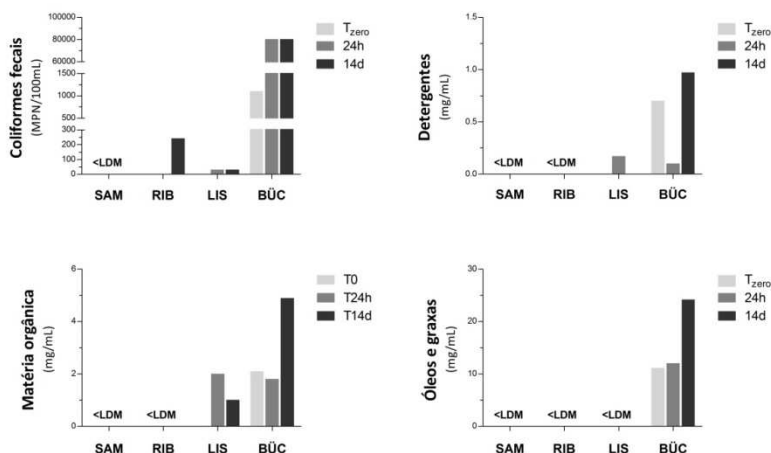


Figura 9 - Parâmetros de qualidade de água analisados em amostras obtidas no experimento de campo. SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local poluído. <LDM: abaixo do limite de detecção do método.

Contaminantes orgânicos – Sedimento

A análise de sedimento apresentou uma concentração de 3 a 7 vezes superior de pesticidas em SAM ($\Sigma\text{DDT} = 11,86 \text{ ng.g}^{-1}$) quando comparada com outros pontos analisados (RIB: 1,58; LIS: 3,78; BUC: 2,89 ng.g^{-1}). O local contaminado BUC apresentou os maiores níveis de hidrocarbonetos alifáticos totais (BUC: 52,6; LIS: 18,4; SAM: 10,0; RIB: 3,67 ng.g^{-1}) e alquilbenzenos lineares totais (ΣLAB) (BUC: 108,0; RIB: 12,1; SAM: 1,56 ng.g^{-1} ; LIS: <LDM). Para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais (ΣHPA), os menores valores foram observados em RIB (14,5 ng.g^{-1}) e os maiores em BUC (112,1 ng.g^{-1}), sendo semelhantes entre LIS (96,9 ng.g^{-1}) e SAM (88,2 ng.g^{-1}) (Figura 10).

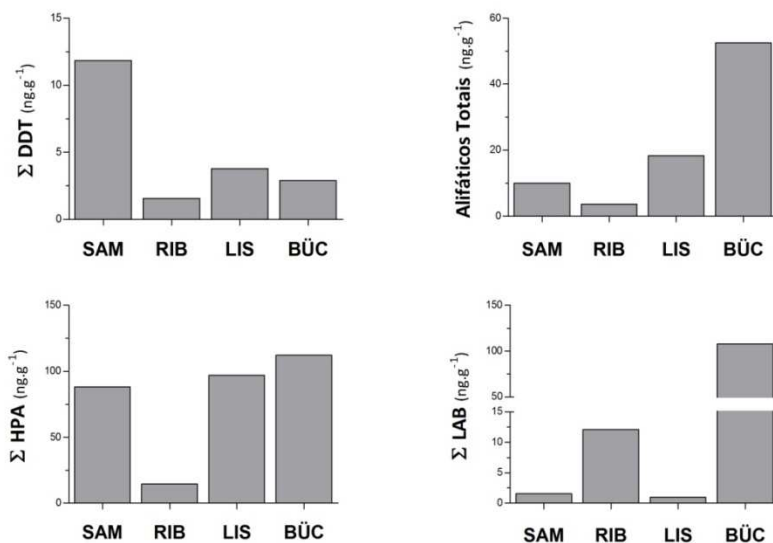


Figura 10 - Níveis de contaminantes orgânicos encontrados nos sedimentos dos locais de exposição (ng. g^{-1} peso seco). SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local contaminado.

Dentre os esteróis fecais, foi identificada a presença de coprostanol no sedimento do BUC, importante biomarcador geoquímico da presença de contaminação por esgoto sanitário. Os valores em BUC ($2,55 \mu\text{g.g}^{-1}$) foram até 125 vezes maiores do que os resultados dos sedimentos coletados nos outros locais analisados (SAM: $0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$; RIB: $0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$; LIS: $0,05 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Figura 11A). Importantes relações entre esteróis fecais, indicativas de contaminação por esgoto sanitário, foram maiores em BUC em relação aos demais locais (Figura 11B).

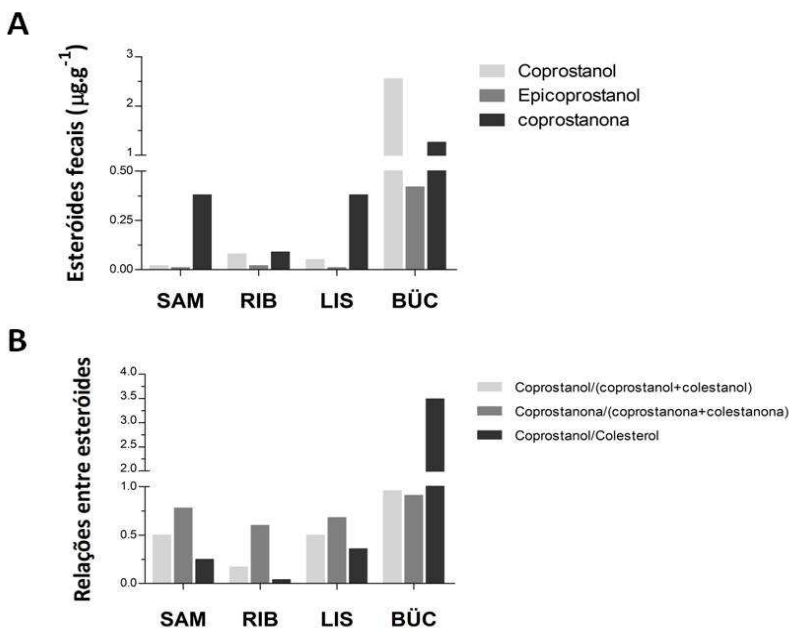


Figura 11 - Níveis de esteroides fecais no sedimento dos locais estudados (A) e relação entre os esteroides fecais (B). SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local contaminado.

Contaminantes orgânicos bioacumulados em ostras

Os animais expostos no local contaminado BUC apresentaram as maiores concentrações para os contaminantes analisados (ΣHPA , ΣLAB e hidrocarbonetos alifáticos totais) após 14 dias de exposição (Figura 12).

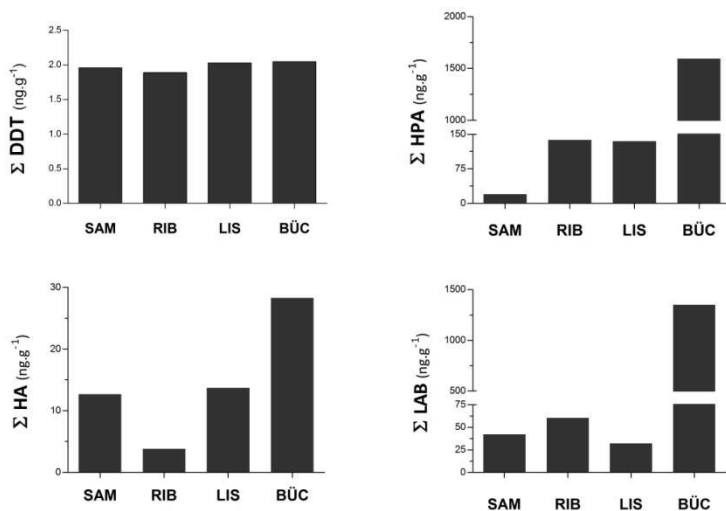


Figura 12 - Níveis de contaminantes orgânicos em ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias nos diferentes locais de estudo. SAM: Sambaqui (origem das ostras); RIB: Ribeirão da Ilha – cultivo; LIS: Santo Antônio de Lisboa - cultivo; BUC: Rio Bücheler – local poluído. <LDM: abaixo do limite de detecção do método.

A ostra *C. gigas* demonstrou grande capacidade de acumular HPAs (11-81 vezes) e LABs (22-42-vezes). Para ΣHPA, maiores níveis foram encontrados nas ostras do BUC (1594,0 ng.g⁻¹) em relação aos locais de cultivo (RIB: 138,0; LIS: 135,0; SAM: 19,6 ng.g⁻¹). Um padrão semelhante foi encontrado para os níveis bioacumulados de ΣLABs (BUC: 1350,0; RIB: 60,4; SAM: 42,3; LIS: 32,1 ng.g⁻¹). Maiores níveis de alifáticos totais também foram encontrados em BUC (28,3 ng.g⁻¹) comparado com os animais mantidos nos outros locais monitorados (LIS: 13,7; SAM: 12,7; RIB: 3,84 ng.g⁻¹). Para ΣDDT, os valores foram semelhantes aos níveis detectados nos animais do tempo zero (SAM: 1,96 ng.g⁻¹), BUC (2,05 ng.g⁻¹) e LIS (2,03 ng.g⁻¹). As ostras mantidas no RIB não apresentaram níveis detectáveis de DDTs (Figura 12).

Discussão

Uma abordagem proteômica é uma excelente ferramenta para fornecer perspectivas ainda desconhecidas das respostas ao estresse ambiental, como o impacto de efluentes urbanos, em nível fenotípico molecular, através da quantificação de alterações na expressão global de proteínas que refletem alterações na síntese de proteínas, pós-traducionais ou na degradação (TOMANEK, 2011). Até o presente momento, inexistem relatos de estudos sobre alterações proteômicas em resposta ao esgoto sanitário em organismos marinhos. Deste modo, no presente estudo foram observadas alterações pós-transcricionais em glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas a um local contaminado por esgoto sanitário em comparação com áreas de cultivo de moluscos marinhos.

O local BUC se confirma como um local contaminado devido aos valores observados para CF, DTG, O/G e MO presente na água; HPAs, AHs, LABs e esteróis fecais no sedimento; e HPAs e LABs bioacumulados nas ostras expostas durante o experimento. Ostras *C. gigas* mantidas no BUC acumularam principalmente HPAs (11-81 vezes mais) e LABs (22-42 vezes mais). Os níveis encontrados na região de estudo comprovam o BUC como local contaminado por esgoto sanitário (SOUZA et al. 2012; FLORES-NUNES et al. artigo no prelo – Cap.2).

Estudos com *C. gigas* já demonstraram o estresse causado por esgoto sanitário nesta região através da observação da atividade de enzimas ligadas ao sistema antioxidante (ZANETTE et al. 2008; SOUZA et al. 2012) e na transcrição de genes (MEDEIROS et al. 2008; TOLEDO-SILVA, 2009; FLORES-NUNES et al. artigo em prep – Cap. 2).

Apesar da informação limitada de proteínas identificadas em ostras e depositadas no banco de dados do NCBI, o presente estudo identificou cinco proteínas diferencialmente expressas em ostras expostas em ambiente contaminado por esgoto sanitário. As proteínas identificadas neste estudo estão relacionadas com citoesqueleto (CKAP5, ACT2), ubiquitinação e via de conjugação (UBE3C), receptor acoplado à proteína G e via de transdução de sinal (SVEP1) e ciclo celular/divisão celular (CCNB3). Das proteínas identificadas, apenas a proteína CKAP5 apresentou maior expressão nas ostras expostas no local contaminado por esgoto sanitário em comparação com as áreas de cultivo, enquanto as proteínas ACT2, UBE3C, SVEP1, CCNB3 apresentaram uma menor expressão nestes mesmos animais (Tabela 3).

Embora estudos possam demonstrar respostas celulares frente ao estresse, células são capazes de se adaptar a um estressor de forma específica em períodos mais longos a fim de manter a homeostase celular (KÜLTZ, 2005). Durante a manutenção da homeostase, as células se adaptam em resposta ao novo ambiente, a fim de manter as funções celulares básicas a longo prazo, exigindo respostas compensatórias mais específicas para o estresse a fim de limitar possíveis danos (TOMANEK, 2011).

No presente estudo foram identificadas duas proteínas com funções relacionadas ao citoesqueleto, com uma maior expressão (13/2 vezes) da CKAP5 (*spot* 0209; Figura 6; Tabela 3) e uma menor expressão (2/3 vezes) da ACT2 (*spot* 2403; Figura 5; Tabela 3) nas ostras mantidas sob influência de efluentes contendo esgoto sanitário. Considerando que os xenobióticos entram na célula através da membrana celular, proteínas relacionadas ao citoesqueleto podem servir como um biomarcador celular importante para poluição ambiental (GOMEZ-MENDIKUTE et al. 2002; JONSSON et al. 2006).

A inibição de proteínas relacionadas com o citoesqueleto foi relatada anteriormente em moluscos bivalves expostos a diferentes contaminantes, como metais-traço e bifenilas policloradas (RODRÍGUEZ-ORTEGA et al. 2003; APRAIZ; MI; CRISTOBAL, 2006). Embora esta resposta possa indicar danos proteicos, a identificação exclusiva de proteínas do citoesqueleto em PESs reflete sua abundância, a prevalência em bancos de dados de moluscos, ou mesmo o seu papel como principais alvos de estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2001; RODRÍGUEZ-ORTEGA et al. 2003; AMELINA et al. 2007; TOMANEK et al. 2011; THOMPSON et al. 2012b).

Inexistem informações quanto à função da proteína do citoesqueleto CKAP5 identificada neste estudo em moluscos bivalves, porém sua função pode estar associada a desafios celulares das ostras frente ao esgoto sanitário. Estas proteínas estão presentes nos microtúbulos que formam o citoesqueleto e possuem interação com as ciclinas B, fundamentais na regulação do ciclo celular, principalmente na fase mitótica (CHARRASSE et al. 2000; KINOSHITA; HABERMANN; HYMAN, 2002; BASTO et al. 2007; CHEN et al. 2009).

Em vertebrados, as CKAP5 são proteínas associadas aos microtúbulos (*MAPs: Microtubule-Associated Proteins*), responsáveis pela codificação das proteínas TOG em humanos (*TOG: Tumor*

Expressed Gene) e as homólogas XMAP215 estudada em rã *Xenopus* sp. (CASSIMERIS; MORABITO, 2004; FRANCONI et al., 2007). Estudos demonstram que estas proteínas possuem relação com a disfunção celular em células tumorais (KINOSHITA; HABERMANN; HYMAN, 2002; CONTE et al., 2003; BOGOCH; LINIAL, 2008; PAULSEN et al., 2009; ROE et al., 2010).

A actina é uma proteína citosólica ubíqua com funções vitais no citoesqueleto, um dos alvos principais do estresse oxidativo em moluscos, e tendo na glutatilonilação e carbonilação um mecanismo inicial de proteção antioxidante (DALLE-DONNE et al., 2003; MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005). A glutatilonilação surge da formação de ponte dissulfeto reversíveis entre a GSH e os grupos de proteínas-SH, podendo ser uma estratégia de proteção destas proteínas durante uma situação de estresse oxidativo (e. g. proteção do grupo tiol das cisteínas) (DALLE-DONNE et al., 2003; MCDONAGH; SHEEHAN, 2006). Entretanto, em mexilhões, a glândula digestiva apresenta uma maior razão do sistema redox GSH/GSSG (MCDONAGH; SHEEHAN, 2006), tornando pouco provável a glutatilonilação da actina neste tecido (DALLE-DONNE et al., 2003).

Modificações irreversíveis são normalmente associadas com a perda permanente da função e podem conduzir à eliminação das proteínas danificadas pelo sistema proteossomal ou sua acumulação na forma de agregados insolúveis (DALLE-DONNE et al., 2007). Deste modo, a actina é organizada de tal forma que alguns dos seus aminoácidos sejam alvos bastante sensíveis à oxidação, tornando-a uma das proteínas mais susceptíveis à carbonilação em situações de estresse oxidativo (CASTRO et al., 2013), especialmente no caso da glândula digestiva dos bivalves, onde a carbonilação de proteínas é mais elevada (DOWLING et al., 2006).

Em altos níveis de EROs e/ou forte comprometimento das defesas antioxidantes, a oxidação irreversível de grupos de proteínas-SH pode alterar funções proteicas de forma permanente, prejudicando, assim, a regulação redox fisiológica das proteínas com cisteínas redox-sensíveis, como no caso da actina. A carbonilação altera as funções desta proteína, promovendo sua agregação e consequente degradação proteossomal evitando sua acumulação (CASTRO et al. 2013). Desta forma, uma menor quantidade de ACT2 (2/3 vezes) em glândula digestiva das ostras expostas ao esgoto sanitário pode estar relacionada à carbonilação desta proteína, que poderia estar sendo degradada ou desnaturada com a perda de função e identificação.

A degradação proteica proteossomal é o mecanismo não-lisossômico mais importante para a reciclagem de aminoácidos nas células (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009). Este complexo possui uma função catalítica que apresenta duas formas predominantes, o núcleo catalítico 20S (marcação ATP e ubiquitina independente) e a forma 26S (dependente de ATP e de ubiquitina) (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009). O proteossomo 26S geralmente requer a ação anterior do sistema ubiquitina (poliubiquitinação), constituído por três tipos de enzimas: ubiquitina ativadora de enzimas E1, ubiquitina conjugadora de enzimas E2 e a ubiquitina ligases E3 (PICKART, 2004; CASTRO et al. 2013).

As ubiquitinas ligases E3 são as enzimas que modificam pós-traducionalmente proteínas pela ligação de uma única porção de ubiquitina (monoubiquitinação) ou uma cadeia de ubiquitinas (poliubiquitinação) (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). A maioria das proteínas poliubiquitinadas são dirigidas para a degradação pelo proteossoma 26S, enquanto que monoubiquitinação pode regular a função e localização das proteínas modificadas ou encaminhá-las para os lisossomos. (KUDRYASHOVA et al. 2005).

Estudos anteriores indicam a carbonilação e ubiquitinação de proteínas em glândula digestiva de moluscos marinhos sob estresse oxidativo (DOWLING et al. 2006; CHORA et al. 2008). Somado a isto, recentemente foi observado que a actina carbonilada em excesso pode sofrer agregação e inibir a atividade proteolítica do proteossomo (CASTRO et al. 2012).

Considerado estes fatos e observando os resultados por estas vias, a ACT2 possivelmente carbonilada e agregada, poderia estar inibindo a degradação via proteossomo e consequentemente, uma menor atividade proteossomal viria a diminuir a reciclagem das ubiquitinas. A menor quantidade de UBE3C neste estudo (4/8 vezes; *spot* 5104; Figura 5; Tabela 3) sugere uma relação com sua baixa disponibilidade no citosol devido a possível quantidade de proteínas sendo ubiquitinadas por UBE3C e baixa reciclagem das ubiquitinas via degradação proteossomal.

Esta hipótese é reforçada pelas descobertas em mexilhões, que sugerem que a carbonilação de proteínas é um processo independente da via de ubiquitinação, onde o acúmulo de proteínas ubiquitinadas poderia comprometer a via de ubiquitinação em situações de estresse oxidativo em bivalves (MCDONAGH; SHEEHAN, 2006). Análises da carbonilação de proteínas e proteômica redox devem ser consideradas

em experimentos com ostras expostas ao esgoto sanitário, bem como a identificação da via de ubiquitinação e degradação de proteínas.

Em outra via, recentemente foi verificada que a CAKP5, proteína do citoesqueleto, interage com a USP19, uma protease específica na edição e reciclagem da ubiquitina. O estudo demonstra que a USP19 interage com as proteínas ubiquitinadas tendo como alvo principal as ubiquitinas ligase E3 (VELASCO et al. 2013). Considerando esse estudo, as maiores quantidades de CAKP5 nas ostras expostas ao esgoto sanitário poderia ter relação com uma necessidade de maior manutenção e disponibilidade de ubiquitinas intracelular, podendo ser uma resposta indireta da menor quantidade de UBE3C estar relacionada com a necessidade de ubiquitinas no citosol.

Dentro da lista de proteínas celulares que são ubiquitinadas encontram-se as reguladoras do ciclo celular, tais como ciclinas (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Estas proteínas são fundamentais para reparar possíveis danos de DNA, completando a mitose (SHACKELFORD; KAUFMANN; PAULES, 2000). Em uma situação de estresse oxidativo, um dano irreparável ou uma perda de coordenação do ciclo celular, promove uma segregação anormal do cromossoma, podendo induzir a apoptose e morte celular (SHACKELFORD; KAUFMANN; PAULES, 2000; LANGLEY, 2007; TOMANEK, 2011). Neste estudo foi observada uma menor expressão (2/5 vezes) da proteína CCNB3 (*spot* 7218; Figura 5; Tabela 3), homóloga à proteína ciclina B3, relacionada com o ciclo celular/divisão celular.

O processo mitótico é altamente dependente da atividade das ciclinas B3 (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004). A destruição da ciclina B é necessária para a saída da mitose, sendo mediada especificamente pela ubiquitina ligase E3 no proteossomo 26S (YU et al. 1996; GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; MIN; LINDON, 2012).

Deste modo, a menor expressão da proteína de ciclo celular CCNB3 (2/5x) observada neste estudo possivelmente interfere na perfeita coordenação do ciclo celular, causando danos de DNA nas ostras expostas ao esgoto sanitário. Esta menor expressão observada pode ter relação com a menor expressão da UBE3C (4/8 vezes). A UBE3C poderia ter relação com a ubiquitinação da ACT2, bem como da CCNB3 neste experimento, dada sua especificidade como proteína-alvo para degradação proteossomal via 26S possivelmente pela UBE3C.

A diminuição na expressão da CCNB3 nas ostras deste estudo poderia também estar relacionada com a alteração da CKAP5, já que

esta proteína do citoesqueleto está relacionada com a regulação da mitose, tal como referido anteriormente. Estudos sugerem uma possível interação das CKAP5 com as proteínas supressoras de tumor p53, reconhecidas como sensores de danos de DNA, inibidoras da primeira fase do ciclo celular G_1 e reguladoras de apoptose (PIEKORZ et al. 2002; LANGLEY, 2007; CHEN et al. 2009). A identificação de uma maior quantidade de CKAP5 poderia estar relacionada com uma defesa precoce ao possível dano celular causado pela menor quantidade de CCNB3 (ciclina da fase $G_2 \rightarrow M$). A maior expressão da CKAP5 estaria relacionada com a necessidade de sinalização de interrupção do ciclo celular já nas primeiras fases da regulação mitótica ($G_0 \rightarrow G_1$) possivelmente para evitar possíveis danos celulares.

As ostras expostas a efluentes contendo esgoto sanitário apresentaram também uma menor expressão (2/5 vezes) da proteína homóloga a SVEP1 (*Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1*; spot 5506; Figura 5; Tabela 3), cuja função em moluscos bivalves é desconhecida. A SVEP1 é uma proteína multi-domínio da matriz extracelular (MEC) compreendendo vários domínios característicos desta estrutura (e. g. von Willebrand factor A domain; pentraxin domain; EGF-like domains; “sushi” domains) (SATO-NISHIUCHI et al. 2012). A associação na mesma molécula destes domínios sugere que a SVEP1 possui funções imunológicas (e. g. sistema do complemento, resposta de fase aguda de infecção, lesão do tecido) e/ou adesão celular (IWANAGA et al. 1992; GILGÈS et al. 2000; BOUCHUT et al. 2006; SCHWARZ; BOSCH; CADAVID, 2008).

Os domínios von Willebrand factor type A-domain (VWA) participam em uma variedade de funções, incluindo a hemostasia e as interações entre as moléculas da MEC, desempenhando um papel importante nas interações proteína-proteína e na montagem de subunidades proteicas (e. g. proteínas multiméricas; microtúbulos, proteínas do citoesqueleto) (FITZGERALD; TING; BATEMAN, 2002; WHITTAKER; HYNES, 2002; BOUCHUT et al. 2006). Em moluscos terrestres, as VWAs estão presentes na hemolinfa, fazendo parte do sistema coagulante imunológico, desempenhando um papel fundamental nos processos de susceptibilidade/resistência na interação parasita-hospedeiro (BOUCHUT et al. 2006). Os domínios Sushi/EGF-like estão relacionados com a modulação do sistema imune e a ativação da cascata coaguladora na hemolinfa de crustáceos, relacionada com endotoxinas

(LPS), maior componente da superfície de bactérias gram-negativas (IWANAGA et al. 1992).

Desta forma, a menor expressão de SVEP1 observada neste estudo poderia estar relacionada com uma redução do sistema imunológico em ostras expostas ao esgoto sanitário. Em estudo paralelo a este, foi verificado que as ostras transplantadas para este mesmo local contaminado (BUC) apresentaram contaminação por *Salmonella* (proteobactéria gram-negativa) após 14 dias de exposição (SOUZA et al. 2012), que poderia estar relacionada à resposta obtida.

Conclusões

De um modo geral, este estudo mostrou a aplicabilidade do uso da análise proteômica em ostras expostas a esgoto sanitário, apesar de apenas cinco proteínas das trinta selecionadas terem sido identificadas. Este resultado pode ser explicado pela presença limitada de proteínas de moluscos bivalves nas bases de dados. A maioria das proteínas de espécies de invertebrados utilizados como bioindicadores em programas de controle de poluição, como no caso dos bivalves, que estão disponíveis nos bancos de dados estão geralmente relacionadas com proteínas do citoesqueleto (RODRÍGUEZ-ORTEGA et al. 2003).

No entanto, para além de duas das proteínas identificadas estarem relacionadas com o citoesqueleto e a estrutura celular (ACT2 e CKAP5), outras proteínas identificadas mostraram que a exposição a esgoto sanitário promove alterações em processos celulares nas células da glândula digestiva das ostras *C. gigas* como ubiquitinação, ciclo celular e transdução de sinal (UBE3C, CCNB3 e SVEP1). Os resultados sugerem que estas alterações poderão causar apoptose e interferências no sistema imune em ostras *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário.

Uma possível relação foi observada entre as proteínas expressas em maior quantidade CKAP5 e as proteínas em menor quantidade ACT2, UBE3C e CCNB3. Estudos futuros com estas proteínas devem ser consideradas em estudos futuros com ostras expostas ao esgoto sanitário.

Este estudo serve de base na identificação de PESs para ostras *C. gigas* expostas a efluentes contendo esgoto sanitário como resposta global do impacto em ambientes costeiros urbanizados. Com a recente publicação do genoma de *C. gigas* (ZHANG et al. 2012), novos estudos

poderão ser realizados a fim de elucidar a função de diferentes proteínas expressas em condições frente aos efluentes urbanos.

Agradecimentos

Estes dados foram gerados durante o doutoramento sanduiche realizado na Universidade do Algarve (Portugal) entre ago/2010 e ago/2011, sob orientação da Profa. Dra. Maria João Bebianno. FFN foi bolsista de doutorado PDEE (CAPES - Processo 1452-10-0).

Referências bibliográficas

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

AMELINA, H. et al. Proteomics-Based Method for the Assessment of Marine Pollution Using Liquid Chromatography Coupled with Two-Dimensional Electrophoresis. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 10, p. 2094-2104, 2007.

APRAIZ, I.; CAJARAVILLE, M. P.; CRISTOBAL, S. Peroxisomal proteomics: biomonitoring in mussels after the Prestige's oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1815-1826, 2009.

APRAIZ, I.; MI, J.; CRISTOBAL, S. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1274-1285, 2006.

BAINY, A. C. D. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 411-416, 2000.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1109-1115, 2004.

BASTO, R. et al. Hsp90 is required to localise cyclin B and Msp/ch-TOG to the mitotic spindle in *Drosophila* and humans. **Journal of Cell Science**, v. 120, p. 1278-1287, 2007.

BEEBY, A. What do sentinels stand for ? **Environmental Pollution** v. 112, p. 285-298, 2001.

BLUM, H.; BIERE, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOGOCH, Y.; LINIAL, M. Coordinated expression of cytoskeleton regulating genes in the accelerated neurite outgrowth of P19 embryonic carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 4, p. 677-690, 2008.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229-246, 2009.

BOSCARDIN, N. R. A Produção Aquícola Brasileira. In: **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008. p. 53-72.

BOUCHUT, A et al. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of adhesion genes. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 2, p. 175-184, 2006.

BRADFORD, M. B. A rapid and sensitive method for the quant- itation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, B. P. et al. Protein expression signatures: an application of proteomics. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 373-377, 2002.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of The Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAMPOS, A. et al. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4346-4359, 2012.

CAO, A. et al. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. **Aquaculture**, v. 295, n. 3-4, p. 149-156, 2009.

CASSIMERIS, L.; MORABITO, J. TOGp , the Human Homolog of XMAP215 / Dis1 , Is Required for Centrosome Integrity , Spindle Pole Organization , and Bipolar Spindle Assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 1580-1590, 2004.

CASTRO, J. P. et al. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 916-925, 2012.

CASTRO, J. P. et al. Actin carbonylation: From cell dysfunction to organism disorder. **Journal of Proteomics**, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.006>

CHARRASSE, S. et al. The Xenopus XMAP215 and its human homologue TOG proteins interact with cyclin B1 to target p34cdc2 to microtubules during mitosis. **Experimental Cell Research**, v. 254, n. 2, p. 249-256, 2000.

CHEN, J. et al. A surface display yeast two-hybrid screening system for high-throughput protein interactome mapping. **Analytical Biochemistry**, v. 390, n. 1, p. 29-37, 2009.

CHEUNG, C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3-4, p. 189-203, 2001.

CHEUNG, C. C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels , *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 181-191, 2002.

CHORA, S.; BEBIANNO, M.; ROMÉO, M. Two-Dimensional Electrophoresis Protocols. *In: Methods in Molecular Biology, Two Dimensional Electrophoresis Protocols*, vol. 519, p. 1-8, 2009.

CHORA, S. et al. Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 95-97, 2008.

CHORA, S. et al. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 300-308, 2009.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater**, 20a. Edição. American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Environment Federation, Washington, DC. 1998.

CONTE, N. et al. TACC1-chTOG-Aurora A protein complex in breast cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 50, p. 8102-8116, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883-898, 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 1624-1632, 2001.

DALLE-DONNE, I. et al. Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1185-1193, 2003.

DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1558-1569, 2010.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Responses in Aquatic Animals - a Review of Determinants of Oxidative Stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1103-1123. 1989.

DOWLING, V. et al. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

(DDE) exposure: a proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 11-8, 20 abr. 2006.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. EPAGRI. 2013. **Síntese informativa da Maricultura**, <http://migre.me/fmlh8>, acessado em 11 de março de 2013, 15h13min.

FITZGERALD, J.; TAY TING, S.; BATEMAN, J. F. WARP is a new member of the von Willebrand factor A-domain superfamily of extracellular matrix proteins. **FEBS Letters**, v. 517, n. 1-3, p. 61-66, 2002.

FLORES-NUNES, F. et al. O impacto do esgoto sanitário na região costeira urbanizada: influência na transcrição de genes em ostras *Crassostrea gigas*. - artigo subm. – Cap.2.

FRANCONE, V. P. et al. The microtubule-associated protein tumor overexpressed gene/cytoskeleton-associated protein 5 is necessary for myelin basic protein expression in oligodendrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 29, p. 7654-7662, 2007.

GHEZZI, P.; BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. **Proteomics**, v. 3, 1145–1153, 2003.

GILGÈS, D. et al. Polydom: a secreted protein with pentraxin, complement control protein, epidermal growth factor and von Willebrand factor A domains. **Biochemical Journal**, v. 352, p. 49-59, 2000.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway : Destruction for the Sake of Construction. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 373-428, 2002.

GOMES, T. et al. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 79-90, 2013.

GÓMEZ-MENDIKUTE, A. et al. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 431-436, 2002.

HUGGETT, R. et al. Introduction. *In: **BIOMARKERS: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress.*** Lewis Publishers, USA, 1992.

IWANAGA, S. et al. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. **Thrombosis Research**, v. 68, n. 1, p. 1-32, 1992.

JONSSON, H. et al. Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutants: a combined CYP-antibody/proteomic approach. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. S49-S56, 2006.

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 4, p. 191-296, 2009.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects.** Londres: CRC Press, 494 p., 1992.

KINOSHITA, K. et al. XMAP215 : a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 267-273, 2002.

KLING, P. et al. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 319-327, 2008.

KUDRYASHOVA, E. et al. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2h that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 2, p. 413-424, 2005.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 225-257, 2005.

LANGLEY, B. C. The Cell Cycle and Oxidative Neuronal Cell Death. **Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders**, v. 16, p. 165-182, 2007.

LAU, P. S.; WONG, H. L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 12, p. 1563-1572, 2003.

LEMOS, M. F. L. et al. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 873-887, 2010.

LÓPEZ, J. L. et al. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. **Marine Biology**, v. 141, n. 2, p. 217-223, 2002.

LÓPEZ, J. L. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences**, v. 815, n. 1-2, p. 261-274, 2005.

MACLEOD, W.D. et al. **Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986**. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121.

MAO, Y. et al. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, 2006.

MARTINS, C. C. et al. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1359-1363, 2008.

MATOS, M. A. C. **Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SP. Brasil**. 2002. 200 f. (Tese de Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2002

MCDONAGH, B.; SHEEHAN, D. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 325-333, 2006.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 315-326, 2005.

MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362-365, 2008.

MIN, M.; LINDON, C. Substrate targeting by the ubiquitin-proteasome system in mitosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 5, p. 482-491, 2012.

MONSINJON, T. et al. Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis*. **Proteome Science**, v. 4, n. 1, p. 17, 2006.

MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 59, n. 1-2, p. 1-15, 2002.

NESATYY, V. J.; SUTER, M. J. Critical Review Proteomics for the Analysis of Environmental Stress Responses in Organisms. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 20, p. 6891-6900, 2007.

OLSSON, B. et al. Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. **Hydrobiologia**, v. 514, n. 1-3, p. 15-27, 2004.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PAULSEN, R. D. et al. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. **Molecular Cell**, v. 35, n. 2, p. 228-239, 2009.

PICKART, C. M. Back to the Future with Ubiquitin. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 181-190, 2004.

PIEKORZ, R. P. et al. The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, p. 653-664, 2002.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. J. et al. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1535-2543, 2003.

RØE, O. D. et al. Malignant pleural mesothelioma: genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets. **Lung Cancer**, v. 67, n. 1, p. 57-68, 2010.

RONZITTI, G. et al. Protein markers of algal toxin contamination in shellfish. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 705-713, 2008.

RUDERT, F.; GE, L.; ILAG, L. L. Functional genomics with protein-protein interactions. **Biotechnology Annual Review**, v. 5, p. 45-86, 2000.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14, 2006.

SATO-NISHIUCHI, R. et al. Polydom/SVEP1 is a ligand for integrin $\alpha 9\beta 1$. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25615-25630, 2012.

SCHWARZ, R. S.; BOSCH, T. C. G.; CADAVID, L. F. Evolution of polydom-like molecules: identification and characterization of cnidarian polydom (Cnpolydom) in the basal metazoan *Hydractinia*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1192-1210, 2008.

SHACKELFORD, R. E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1387-1404, 2000.

SHEPARD, J. L.; BRADLEY, B. P. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 457-463, 2000.

SHEPARD, J. L. et al. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 457-463, 2000.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins - vitamin-e and vitamin-c, beta-carotene, and other carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, p. 7-20. 1992.

SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 153-161, 2012.

STOREY, K. B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1715-1733. 1996.

THOMPSON, E. L. et al. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 202-212, 2012 (a).

THOMPSON, E. L. et al. Proteomic analysis of Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*) exposed to metal contamination in the field. **Environmental Pollution**, v. 170, p. 102-112, 2012 (b).

TOLEDO-SILVA, G. **Análise da expressão gênica diferencial em ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ***. 2009. 98 f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TOMANEK, L. et al. Proteomic response to elevated P_{CO_2} level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, p. 1836-1844, 2011.

TOMANEK, L. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis and development. **Annual Review of Marine Sciences**, v. 3, p. 373-399, 2011.

UNEP (1992). **Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments**, Reference Methods for Marine Pollution studies 20, 77p.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). **Occurrence of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater From Nine Publicly Owned Treatment Works**. 2009. 85p. Disponível em: <http://migre.me/fmm2B>.

VELASCO, K. et al. An N-terminal SIAH-interacting motif regulates the stability of the ubiquitin specific protease (USP)-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, p. 390-395, 2013.

VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; HELBING, C. C. Molecular profiling of marine fauna: integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 23-38, 2012.

WHITTAKER, C. A.; HYNES, R. O. Distribution and Evolution of von Willebrand / Integrin A Domains : Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 3369-3387, 2002.

YU, H. et al. Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. **Current Biology**, v. 6, n. 4, p. 455-466, 1996.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198, 2008.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DOS ALQUILBENZENOS LINEARES E DO ESGOTO SANITÁRIO NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM OSTRAS DO PACÍFICO *Crassostrea gigas*

Fabício Flores- Nunes¹; Jacó J. Mattos²; Flávia L. Zacchi¹; Miguel A. S. Serrano¹; Clei E. Piazza¹; Silvio Sasaki³; Satie Taniguchi³; Márcia Bicego³; Cláudio M. R. Melo⁴; Afonso C. D. Bainy¹

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

² Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

³ Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁴ Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

*Este capítulo está sendo preparado para publicação no periódico *Aquatic Toxicology* (Estrato A1 – Zootecnia/Recursos Pesqueiros).

Resumo

Estima-se que até 2015, mais de um quinto da população mundial estará habitando a região costeira, sendo que o maior crescimento deverá ocorrer nos países em desenvolvimento, especialmente em áreas urbanas. Os efluentes gerados nestas áreas são ricos em nutrientes, matéria orgânica, fármacos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, hidrocarbonetos, alquilbenzenos lineares (LABs) entre outros. Os LABs são os principais componentes na formulação de produtos de limpeza, higiene pessoal, industrial têxtil, petroquímico e medicamentos. A ostra *Crassostrea gigas* apresenta alta capacidade de bioacumulação de LABs, existindo uma lacuna de informações sobre os efeitos deste contaminante em bivalves marinhos. No presente estudo foi analisada a transcrição de genes em dois tecidos de *C. gigas* durante 36h de exposição aos LABs e ao esgoto sanitário (12h, 24h e 36h), bem como a atividade de enzimas antioxidantes e biotransformação (36h). Ostras expostas aos LABs isoladamente e ostras expostas ao esgoto sanitário apresentaram padrões de respostas transcricionais diferentes. O efeito isolado da mistura de LABs em ostras é bem menor do que quando está presente no esgoto sanitário. Apesar da capacidade da ostra *C. gigas* em bioacumular LABs (28 vezes mais), este poluente isoladamente parece não ser o responsável pelas respostas transcricionais observadas em ostras expostas ao esgoto sanitário. Estas respostas podem estar associadas aos diferentes níveis bioacumulados deste contaminante pelos tratamentos, ou à presença de outros contaminantes no esgoto sanitário, que podem ter causado efeitos sinérgicos, aditivos ou antagonicos. A necessidade de informações sobre a influência dos contaminantes na ativação de vias metabólicas específicas em moluscos bivalves torna-se fundamental para a compreensão da modulação da transcrição gênica, das respostas observadas em biomarcadores moleculares/ bioquímicos e interação entre os genes responsivos. Os resultados comprovam que os genes *FABP* e *GST-Q* apresentam uma resposta imediata em tecidos de ostra *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário, o que indica uma possível resposta protetora destes animais e uma importante função destes genes na manutenção da homeostase destes organismos.

Palavras-chave: Alquilbenzenos lineares, Esgoto sanitário, Transcrição diferencial de genes, Enzimas antioxidantes, *Crassostrea gigas*.

INFLUENCE OF LINEAR ALKYL BENZENES MIXTURES AND SANITARY SEWAGE IN BIOCHEMICAL AND MOLECULAR RESPONSES IN PACIFIC OYSTERS *Crassostrea gigas*

Abstract

It is estimated that by 2015, more than a fifth of the global population will be living in the coastal zone, while the highest growth is expected to occur in the developing countries, especially in urban areas. The effluent generated in these areas are rich in nutrients, organic matter, pharmaceuticals, personal care products, pesticides, hydrocarbons, linear alkylbenzenes (LABs) among others. LABs are key components in the formulation of cleaning and personal care products, and the garment industry, petrochemicals and pharmaceuticals. Oyster *Crassostrea gigas* shows high potential to LABs bioaccumulation, but there is a gap in the information about the effects of this contaminant in marine bivalves. The aim of this study was to analyze the transcription of genes in two tissues of *C. gigas* along the 36h of exposure to LABs and sanitary sewage (12h, 24h and 36h), and antioxidant enzymes and biotransformation activities (36h). Oysters exposed to LABs individually and oysters exposed to sanitary sewage showed different patterns of transcriptional responses. The effect of LABs isolated from the mixture in oysters is much smaller than when it is presented in the sanitary sewage. Despite the ability of the oyster *C. gigas* to bioaccumulate LABs (28 times more), this pollutant alone seems not to be responsible for the transcriptional responses observed in oysters exposed to sanitary sewage. These responses may be associated with different levels of this contaminant accumulated by the treatments, or the presence of other contaminants in sanitary sewage, which may have been caused synergistic, additive or antagonistic effects. The information concerning the influence of contaminants in the activation of specific metabolic pathways in bivalve mollusks is fundamental for understanding the modulation of gene transcription, the responses observed in molecular/biochemical biomarkers and relationship between responsive genes. The results indicate that *FABP* and *GST-Q* genes have an immediate response in tissues of oyster *C. gigas* exposed to sanitary sewage, indicating a possible protective response and an important role of these genes in maintaining homeostasis of these organisms.

Keywords: Linear alkylbenzenes mixtures, Sanitary sewage, Differential gene transcriptions, Antioxidant enzymes, *Crassostrea gigas*.

Introdução

Estima-se que até 2015, mais de um quinto da população mundial estará habitando a região costeira, sendo que o maior crescimento deverá ocorrer nos países em desenvolvimento, especialmente em áreas urbanas que não possuem infraestrutura suficiente de coleta e tratamento de esgoto (CORCORAN et al., 2010). No Brasil, aproximadamente 25% da população está concentrada em 400 municípios localizados na zona costeira, com uma densidade populacional quase cinco vezes maior que a média nacional (SERAFIM; HAZIN, 2006).

O esgoto sanitário produzido pelos centros urbanos costeiros é uma das principais fontes de contaminação em regiões costeiras urbanizadas (KENNISH, 1992). Estudos demonstram o impacto do esgoto sanitário nestes locais (ZANETTE et al., 2008; SOUZA et al., 2013; FLORES-NUNES et al., 2013 – em prep.). Além de nutrientes e matéria orgânica, o esgoto sanitário é composto de uma mistura complexa de poluentes como fármacos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, hidrocarbonetos, alquilbenzenos lineares (LABs) entre outros (ABESSA et al., 2005; GAGNÉ et al., 2007).

Os LABs são os principais componentes na produção dos alquilbenzenos lineares sulfonados (LASs), utilizados como surfactantes na formulação de produtos de limpeza e higiene pessoal (TAKADA; ISHIWATARI; OGURA, 1992; TSUTSUMI et al., 2002). Por possuírem propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas em uma mesma molécula, os surfactantes agem eficientemente na limpeza e solubilização de resíduos. Os LASs também são utilizados no setor industrial têxtil, petroquímico, de medicamentos, entre outros (YING, 2006).

O aumento do uso de detergentes está intimamente ligado ao crescente aumento do padrão de vida e de consumo (MUNGRAY; KUMAR, 2009). Em 2010, o consumo mundial de LABs foi aproximadamente 8,34 milhões de toneladas, sendo que 60% foi destinado para a indústria de detergentes, produção de LASs (aprox. 5×10^6 ton) (EDSER, 2012). Durante a produção dos LASs, cerca de 3% dos LABs permanecem como resíduo nestas formulações (MACÍAS-ZAMORA; RAMÍREZ-ALVAREZ, 2004). Assim, estima-se que cerca de 150.000 toneladas de LABs são lançadas no ambiente por utilização de detergentes, sendo cerca de 2.000 toneladas apenas em países europeus (HANSEN et al., 2000).

Os LABs encontrados em áreas costeiras têm origem no esgoto sanitário e industrial não tratado (TAKADA; ISHIWATARI; OGURA, 1992; ISOBE et al., 2004). Por serem mais resistentes ao ataque microbiano no ambiente que o LASs, os LABs têm sido utilizados como marcadores moleculares de contaminação por esgoto sanitário em áreas costeiras urbanizadas (EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983; RAYMUNDO; PRESTON, 1992; MACÍAS-ZAMORA; RAMÍREZ-ALVAREZ, 2004; RINAWATI et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Os LABs, devido às suas características hidrofóbicas, podem acumular tanto no sedimento, quanto nos tecidos biológicos (SHERBLOM; GSCHWEND; EGANHOUSE, 1992; VENKATESAN; NORTHRUP; PHILLIPS, 2002; BOONYATUMANOND et al., 2007). Tsutsumi e colaboradores (2002) observaram que mexilhões coletados em áreas próximas a regiões urbanizadas continham até 14 vezes mais LABs em seus tecidos do que os animais coletados em regiões afastadas.

Dados recentes mostraram que ostras *Crassostrea gigas* mantidas em uma região contaminada por esgoto sanitário bioacumularam 10 vezes mais LABs que ostras de áreas de cultivo (SOUZA et al., 2012). Apesar da alta capacidade de bioacumulação de LABs em ostras, inexistem informações sobre os efeitos deste contaminante em bivalves marinhos. As principais referências dos efeitos dos LABs estão em estudos realizados com vertebrados. Nessas pesquisas, foram observados efeitos genotóxicos e teratogênicos em ratos tratados com LABs (ROBINSON; NAIR, 1992; ROBINSON; SCHROEDER, 1992).

Ostras são cosmopolitas, sésseis e filtradoras, características que possibilitam uma maior bioacumulação de contaminantes e sua utilização como organismo sentinela (BURNS; SMITH, 1981; CAJARAVILLE et al., 2000; OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003). A ostra *C. gigas* é uma das espécies mais cultivada, consumida e estudada no mundo (MAO et al., 2006; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). Vários estudos têm utilizado esta espécie como sentinela de ambientes contaminados devido a sua capacidade de acumular poluentes orgânicos persistentes (POPs) (HUNTER et al., 1995; CAPUZZO, 1996; GUNTHER et al., 1999; ZANETTE et al., 2008; SOUZA et al., 2012).

Em nível celular, os contaminantes atuam como efetores que ativam ou reprimem receptores celulares, que por sua vez interagem com sequências específicas de DNA no núcleo promovendo a ativação ou repressão da transcrição de vários genes. Moléculas de RNA

mensageiro (RNAm) são enviadas ao citoplasma para que ocorra a síntese proteica (PIÑA; CASADO; QUIROS, 2007).

Análises de alterações bioquímicas e moleculares em moluscos marinhos se mostram como ferramentas adequadas de monitoramento e avaliação de impactos ambientais (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; RODRÍGUEZ-ORTEGA et al., 2002; ALLEN; MOORE, 2004; MOORE et al., 2004; FOWLER, 2005). Estas alterações, em diferentes níveis, expressam os efeitos de agentes estressores e são chamadas de biomarcadores (HUGGETT et al., 1992). Servindo como sinais prévios, os biomarcadores podem antecipar danos ambientais em maior nível de organização biológica (CAJARAVILLE et al., 2000; WALKER et al., 2001).

Os biomarcadores podem indicar a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), bem como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000). Os biomarcadores moleculares, baseados principalmente no estudo da transcrição de genes relacionados com determinadas respostas bioquímicas e celulares, vêm recebendo especial atenção nos últimos anos.

A transcrição gênica representa o primeiro nível de resposta ao estressor e direciona a síntese de proteínas do organismo às mudanças externas (BRULLE et al., 2008). As alterações no padrão de transcrição gênica permitem analisar a resposta ao estressor em uma população contribuindo para a elucidação dos mecanismos de resposta aos estímulos ambientais (JU et al., 2006; BRULLE et al., 2008).

Em ambientes poluídos, pode ocorrer o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e, neste caso, os organismos necessitam aumentar suas defesas antioxidantes a fim de evitar os efeitos nocivos causados por contaminantes. No entanto, para proteger contra os efeitos deletérios das EROs, as células possuem sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante envolve enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). SOD catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é degradado pela CAT e GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Enzimas auxiliares, tais como a glutathione redutase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), reciclam GSH e NADPH, respectivamente, contribuindo para a manutenção de

um ambiente redox intracelular ótimo para o bom funcionamento do metabolismo celular (CIRCU; AW, 2010).

O desequilíbrio entre agentes pró e antioxidantes nas células, causado pela exposição a contaminantes, pode induzir uma situação de estresse oxidativo nos organismos, ocasionando processos mutagênicos, carcinogênicos e morte celular (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992; REGOLI et al., 2002).

Recentes pesquisas utilizando biomarcadores demonstram o impacto do esgoto sanitário em organismos aquáticos marinhos (ZANETTE et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008a; COMOGLIO et al., 2011; ANDREW-PRIESTLEY et al., 2012; MARIGÓMEZ et al., 2013). *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário aumentaram a transcrição de genes que codificam a proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), a glutatona S-transferase ômega (*GST-Ω*) e o citocromo P450 isoforma 356A1 (*CYP356A1*) (MEDEIROS et al., 2008b; TOLEDO-SILVA et al., 2008; SIEBERT et al., 2009) e recentemente validados em experimento *in situ* (FLORES-NUNES et al., - artigo em prep. – Cap. 2).

As FABPs transportam uma variedade de compostos hidrofóbicos além dos ácidos graxos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (STORCH; THUMSER, 2000; ESTEVES; EHLRICH, 2006).

As GSTs são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de uma ampla gama de substratos eletrofílicos, geralmente produzidos durante a fase-I da biotransformação de compostos orgânicos, com o tripeptídeo endógeno glutatona (STOREY, 1996). Assim, desempenham um papel fundamental no processo de eliminação de EROs, na regulação do equilíbrio redox da célula, na prevenção de danos de membrana celular e outras macromoléculas, bem como na resposta do sistema imune inato (KONINGS; PENNINGA, 1985; SIRITANTIKORN et al., 2007; KIM et al., 2009; WANG et al., 2013). Boutet, Tanguy e Moraga (2004) observaram um aumento do nível transcricional no mRNA do gene *GST-Ω* em ostras *C. gigas* após três dias de exposição a hidrocarbonetos.

Os citocromos P450 (CYP) estão entre as enzimas mais importantes para a manutenção da homeostase, estresse oxidativo e na biotransformação de xenobióticos (GUENGERICH, 1987; STEGEMAN; HAHN, 1994). Toledo-Silva e colaboradores (2008)

identificaram o gene *CYP356A1* em *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário.

Ostras podem se adaptar aos produtos químicos presentes no esgoto, fazendo uso de diferentes estratégias para sobreviver em áreas poluídas. A transcrição de genes relacionados com diferentes funções metabólicas, como biotransformação, transporte de membrana, o metabolismo aeróbico e maquinaria de tradução podem ocorrer para auxiliar na manutenção da homeostase celular.

Desta forma, a aplicabilidade potencial da análise da transcrição de genes que possuem papéis importantes no metabolismo e biotransformação podem servir como sinal precoce de alerta para o monitoramento da qualidade da água utilizando bivalves como organismos sentinela (MEDEIROS et al., 2008b). Sendo assim, genes que codificam proteínas e enzimas potencialmente responsivas ao estresse oxidativo e biotransformação (ex. *SOD*, *CAT*, *G6PDH*, *GST-II*, *HSP70*) devem ser consideradas em estudos de toxicidade de poluentes emergentes como biomarcadores de exposição e/ou efeito.

Considerando (1) a relação entre o esgoto sanitário e a presença de LABs; (2) a bioacumulação dos LABs em relação a outros poluentes por moluscos marinhos expostos ao esgoto sanitário; (3) e a transcrição de genes responsivos ao esgoto sanitário; o presente estudo teve como objetivo verificar a influência dos LABs em ostras *C. gigas* através da avaliação das respostas dos sistemas de defesa antioxidante e de biotransformação, utilizando biomarcadores bioquímicos (*SOD*, *CAT*, *GR*, *GPx*, *G6PDH*, *GST*) e moleculares (estresse celular *HSP70*, transporte e armazenamento *FABP*, biotransformação *CYP 356A1*, *GST-Ω*, *GST-II*; e sistema antioxidante *SOD*, *CAT*, *G6PDH*).

Metodologia

Coleta e aclimação dos animais

As ostras *C. gigas* (n=200) foram obtidas na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), na Praia de Sambaqui (Florianópolis, SC), limpas, classificadas e transportadas até o LMM, Lagoa da Conceição, onde permaneceram por um período de aclimação de 10 dias em dois tanques de 200 litros. Durante este período, as ostras foram alimentadas com uma dieta de manutenção (20×10^4 células.mL⁻¹, sendo mix 50% *Isochrysis galbana* e 50%

Chaetoceros muelleri) e aclimatadas à salinidade 25. Após jejum de 24h, os animais foram transportados às unidades experimentais.

Delineamento experimental

C. gigas (n = 50) foram distribuídas em quatro aquários de vidro na proporção de 1 ostra por litro de água do mar filtrada em salinidade 25 e temperatura da água 25°C. Ao grupo exposto foi adicionada uma mistura de LABs (DETEN Química S.A. - DetLAB® 240) em uma concentração nominal de 40 µg.L⁻¹. Foram utilizados três grupos controle: CT - controle (água do mar filtrada); ESG - controle positivo (água do mar + esgoto sanitário 33%); CS - controle solvente do LAB (água do mar + 1 mL Etanol). O esgoto utilizado foi coletado diretamente na Estação de Tratamento de Efluentes Insular da Companhia de Águas e Saneamento de Santa Catarina (CASAN, Florianópolis, SC) e utilizado segundo metodologia descrita por Medeiros e colaboradores (2008a). O valor da concentração nominal utilizada para os LABs neste experimento está relacionado com a concentração do contaminante bioacumulado em experimento *in situ* (FLORES-NUNES et al. Cap II) e com a solubilidade do composto em água

Amostras de brânquias e glândula digestiva dos animais expostos (n=10) foram coletadas a cada doze horas de exposição (T12h, T24h, T36h) e preservadas em RNA Later, para posterior análise de biomarcadores moleculares. Ao final do experimento (36h), outras amostras de brânquias e glândula digestiva (n=10) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80° C para a realização das análises bioquímicas. Um *pool* de seis ostras de cada tratamento foi coletado ao final do experimento para a análise de contaminantes orgânicos no Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP).

Biomarcadores Bioquímicos

Preparação das amostras biológicas

As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,6, EDTA 1mM, sacarose 0,5M, KCl 0,15M, DTT 1mM, PMSF 0,1mM, na proporção de 1 : 4 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado

a 9.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em alíquotas e estocado em freezer - 80°C para as análises bioquímicas.

Análise dos biomarcadores bioquímicos

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada de acordo com Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição da H_2O_2 pela enzima, através do decréscimo de absorbância a 240 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ m.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 25°C. A determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizada segundo o ensaio descrito por KEEN, HABIG e JAKOBY (1976), que se baseia na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH, quantificado pelo aumento de absorbância a 340 nm monitorado durante dois minutos em espectrofotômetro.

A glutathione redutase (GR) utiliza elétrons do NADPH para reduzir o substrato glutathione oxidada (GSSG). O decréscimo de absorbância no comprimento de onda de 340 nm serve como medida da atividade desta enzima. (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi medida indiretamente a partir do monitoramento da taxa de oxidação de NADPH a 340 nm, utilizando hidroperóxido de cumeno (CuOOH), de acordo com Wendel (1981). A atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada através do aumento de absorbância provocado pela redução de NADP^+ a NADPH, no comprimento de onda de 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (GLOCK; MCLEAN, 1953). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi quantificada conforme método descrito por McCord e Fridovich (1969). A determinação do conteúdo total de proteínas presentes na fração sobrenadante foi realizada de acordo com Peterson (1977), utilizando soro albumina bovina como padrão.

Biomarcadores moleculares

Preparação das amostras para análises moleculares

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies). A concentração e pureza do RNA foi checada no espectrofotômetro NanoDrop software ND1000 (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando a absorbância a 260 nm e a relação de 260/280nm, respectivamente. A transcrição reversa para síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total

foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Técnica de RT-PCR em tempo real

Desenho de iniciadores e criação da biblioteca de genes de interesse

Os iniciadores utilizados foram desenhados com base em sequências de genes depositados para *C. gigas* no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e de hibridizações subtrativas supressivas realizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy para esta espécie. O mesmo grupo de genes validados em experimento *in situ* foram utilizados neste estudo (FLORES-NUNES et al., – artigo subm. – Cap. 2). Os iniciadores utilizados foram desenhados para amplificação dos genes da *Tubulina β* (normalizador), *Citocromo P450 família 356A1* (*CYP356A1*), *Proteína de choque térmico 70* (*HSP70*), *Proteína ligante de ácidos graxos* (*FABP*), *Glutathione S-transferase classe ômega* (*GST- Ω*), *Glutathione S-transferase classe pi* (*GST-II*), *Superóxido dismutase* (*SOD*), *Catalase* (*CAT*) e *Glicose 6-fostato desidrogenase* (*G6PDH*) (Tabela 1).

Tabela 7 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de cada gene e código de acesso no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Gene	Acesso GenBank	Sequencia dos iniciadores	
		Foward	Reverse
<i>Tubulina β</i>	AB196534	CCAGCAGATGTTGACGCCAAGAA	AACATGGCAGCAACGGTGAGGTAG
<i>CYP356A1</i>	EF645271	ATGAAACCCGCGAAACCA GA	TAAATTCGGCTTCACGCCCT
<i>HSP70</i>	ABJ55915	ACCCGTTCCAGAGTTCTTGGGTTT	ATCGGACGAGGGCCACAGTTATTT
<i>FABP</i>	EU069496	TCCGACGGAAAGATGACGCTTT	ACGCCATTGCATGTTGCTGT
<i>GST-O</i>	AJ557141	TGATGAGTTCACCACGCAA	TTCAAACCATGGCCACAGCA
<i>GST-II</i>	AJ557140	CACCATTACGACTTTGTGGCAGA	TCAGCCATTTCCGGTAGCCTCTCTT
<i>SOD</i>	AJ496219	GGCCCTCAATCCATCATTGGAAGA	TGATACCGATCACTCCACAAGCCA
<i>CAT</i>	EF687775	AGCTAATCGTTTGTCTGCCGAGGA	ACACCTTGTCACATCGAACGGGT
<i>G6PDH</i>	AM076951	TCTCAAGGCTGGCTGTATGTCCAA	TGCCGAGATAATGGTCGATTGGGT

Padronização das condições de PCR em tempo real

Para obtenção dos níveis de eficiência recomendados para o método foram realizadas padronizações utilizando curvas de concentração de cDNA das amostras e de iniciadores. As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata em um volume total de 20 μ L

utilizando o kit Quantifast® SYBR Green PCR Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Análise dos resultados

Os níveis de transcrição gênica foram analisados utilizando um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Corbett Life Science). A transcrição do gene normalizador (*Tubulina β*) foi utilizada para o cálculo da transcrição diferencial entre os grupos pelo método do $\Delta\Delta CT$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

As análises de atividade enzimática da SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PDH foram realizadas em amostras de brânquias e glândula digestiva das ostras expostas por 36 h. Os resultados de ESG e LAB foram comparados com o CT e CS, respectivamente (ESGxCT; LABxCS).

Análise de contaminantes orgânicos

Para avaliar os níveis de LABs, grupos de ostras ($n = 6$) foram coletados em cada tratamento ao final do experimento (36 horas) e congelados. Os tecidos foram secos durante 72 horas em liofilizador (Thermo Savant, módulo D), macerados, homogeneizados em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente.

O procedimento metodológico foi baseado em MacLeod et al. (1986) com algumas modificações. Um grama de cada uma das amostras foi extraído com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em soxhlet durante 8 horas. Antes da extração foram adicionados 100 μL dos padrões surrogate com diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. O padrão interno dos alquilbenzeno lineares (LABs) foi o dodecil alquilbenzeno ($1C_{12}LAB$, 5 $ng.\mu L^{-1}$).

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 g de sílica gel sobre 16 g de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 grama de sulfato de sódio (J. T. Baker). A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase

móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e adicionados os padrões internos (1C₁₉LAB). As amostras foram avolumadas 1 mL. Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies.

A identificação dos LABs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA e Fluka, Suíça. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados também através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z). A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média e desvio padrão. Os tratamentos foram comparados com seus respectivos controles (ESGxCT; LABxCS). Os dados foram submetidos à verificação de outliers (teste de Grubbs), teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e, de acordo com os resultados, submetidos ao teste paramétrico (teste “t” de Student) ou não paramétrico (Mann-Whitney). Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.01.

Resultados

Níveis de LAB em *Crassostrea gigas*

As ostras expostas ao LABs por 36h na concentração nominal de 40 µg.L⁻¹ apresentaram níveis 28 vezes maior de ΣLAB em relação ao seu respectivo controle (CS). Ostras expostas ao esgoto sanitário (ESG) acumularam 1,45 vezes mais estes contaminantes que as ostras que permaneceram em água limpa (CT). *C. gigas* expostas aos tratamentos LAB e ESG acumularam 1.441,53 ng.g⁻¹ e 129,9 ng.g⁻¹ de ΣLAB, respectivamente. Os menores valores foram observados nos controles, com CS menor que CT (51,41 ng.g⁻¹ e 89,74 ng.g⁻¹, respectivamente) (Figura 1).

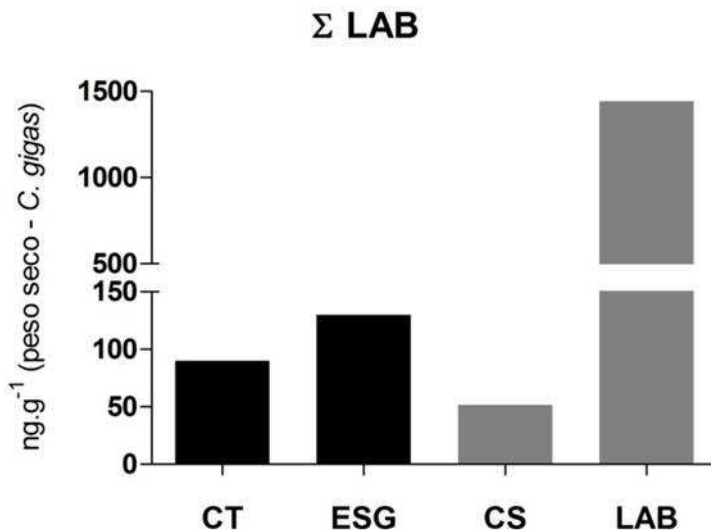


Figura 1 - Níveis de LABs em tecidos de *Crassostrea gigas* expostas durante 36 horas a 40 µg.L⁻¹ de alquilbenzenos lineares (LAB) e esgoto sanitário (ESG diluído 33%). CS: controle solvente; LAB: alquilbenzenos lineares; CT: controle; ESG: esgoto sanitário.

Resultado dos biomarcadores bioquímicos

Ostras do grupo ESG apresentaram uma maior atividade das enzimas SOD e GR nas brânquias, e GST em ambos tecidos. Os animais expostos ao LAB apresentaram uma maior atividade GR em glândula digestiva e G6PDH em ambos os tecidos. CAT e GPx não apresentaram nenhuma alteração de atividade nos animais expostos ao ESG e LAB, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 2).

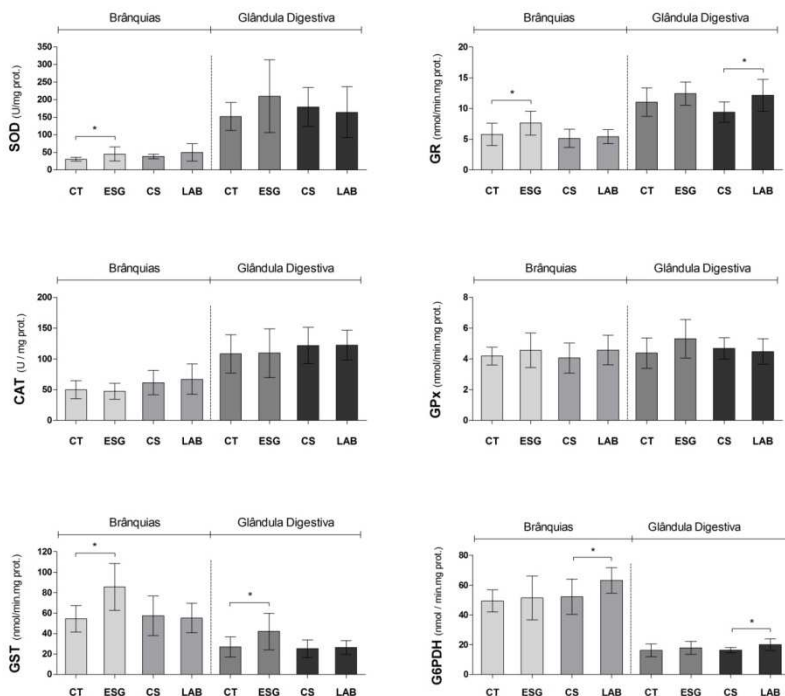


Figura 2 - Atividade das enzimas analisadas em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*. CT: controle; ESG: esgoto sanitário 33%; CS: controle solvente; LAB: alquilbenzenos lineares 40 µg.L⁻¹ (p < 0,05). SOD: superóxido dismutase; GR: glutatona redutase; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GST: glutatona S-transferase; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase.

Resultado dos biomarcados moleculares

Os genes testados como biomarcadores moleculares (*HSP70*, *SOD*, *CAT*, *G6PDH*, *FABP*, *CYP356A1*, *GST-II*, *GST-Q*) foram analisados em brânquias e glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas por 12h, 24h e 36h a esgoto sanitário ou LAB, tendo sido comparados aos seus respectivos controles (LABxCS; ESGxCT). O gene *Tubulina β* foi escolhido como normalizador.

As ostras tratadas com LABs apresentaram uma maior transcrição dos genes *SOD* (1,8 vezes) e *G6PDH* (1,9 vezes) na glândula digestiva após 36h de exposição. A transcrição do gene *HSP70* na brânquia dos

animais foi significativamente maior tanto no grupo exposto por 24h (2,6 vezes) como no grupo exposto por 36h (2,5 vezes). Baixos níveis de transcrição do *CYP356A1* (1,3 vezes) foram observados na glândula digestiva das ostras expostas por 12h aos LABs e na *GST-II* (2,0 vezes) da brânquia dos animais expostos por 36h a este composto. Nenhuma alteração foi observada na transcrição dos genes *CAT*, *FABP* e *GST-Ω* nos tecidos dos animais expostos aos LABs nestes períodos de exposição.

Os níveis de transcrição de todos os genes analisados nas ostras expostas ao esgoto sanitário (ESG) apresentaram variações em relação ao controle (CT) (Figura 3). O gene *FABP* apresentou uma maior transcrição em brânquias dos animais expostos nos três períodos de exposição, sendo que o grau de transcrição foi reduzindo com o tempo (12h: 19 vezes; 24h: 17 vezes; 36h: 8 vezes). Na glândula digestiva a *gene da FABP* apresentou uma transcrição 2,3 vezes maior que o controle após 24h de exposição.

CYP356A1 apresentou uma maior transcrição em brânquias em 12h (5,7 vezes) e 24h de exposição (2 vezes) e em glândula digestiva após 24h (1,6 vezes) e 36h de exposição (2,1 vezes). *GST-Ω* apresentou uma maior transcrição em brânquias após 12h de exposição (36,7 vezes), que permaneceram elevados até o final do experimento (24h: 23,3 vezes; 36h: 24,7 vezes). Da mesma forma, o nível de transcritos deste gene na glândula digestiva aumentou nos animais expostos, tendo atingido maiores valores nos animais expostos por 24h (12h: 20,2 vezes; 24h: 32,1 vezes; 36h: 30,4 vezes).

O gene da *GST-II* somente apresentou níveis transcricionais mais elevados (3,6 vezes) nas brânquias dos animais expostos por 24 h ao esgoto. Na glândula digestiva das ostras expostas ao esgoto foram observados níveis mais elevados da transcrição da *SOD* (1,3 vezes) após 12h de exposição, que decaíram cerca de 7 vezes após 24h de exposição e retornaram a níveis semelhantes ao do controle após 36h.

A transcrição da *CAT* foi 2,3 vezes menor na glândula digestiva dos animais expostos por 36h. O nível transcricional de *G6PDH* foi menor em ambos tecidos após 36h de exposição (brânquias: 1,7 vezes; glândula digestiva: 2,7 vezes). A transcrição de *HSP70* nas brânquias foram, respectivamente, 2,6 e 3,6 vezes maiores nos animais expostos por 12 e 36h. Perfil semelhante foi observado também na transcrição de *HSP70* da glândula digestiva dos mesmos animais, sendo maiores que o CT (12h: 2,8 vezes; 36h: 2 vezes) (Figura 3).

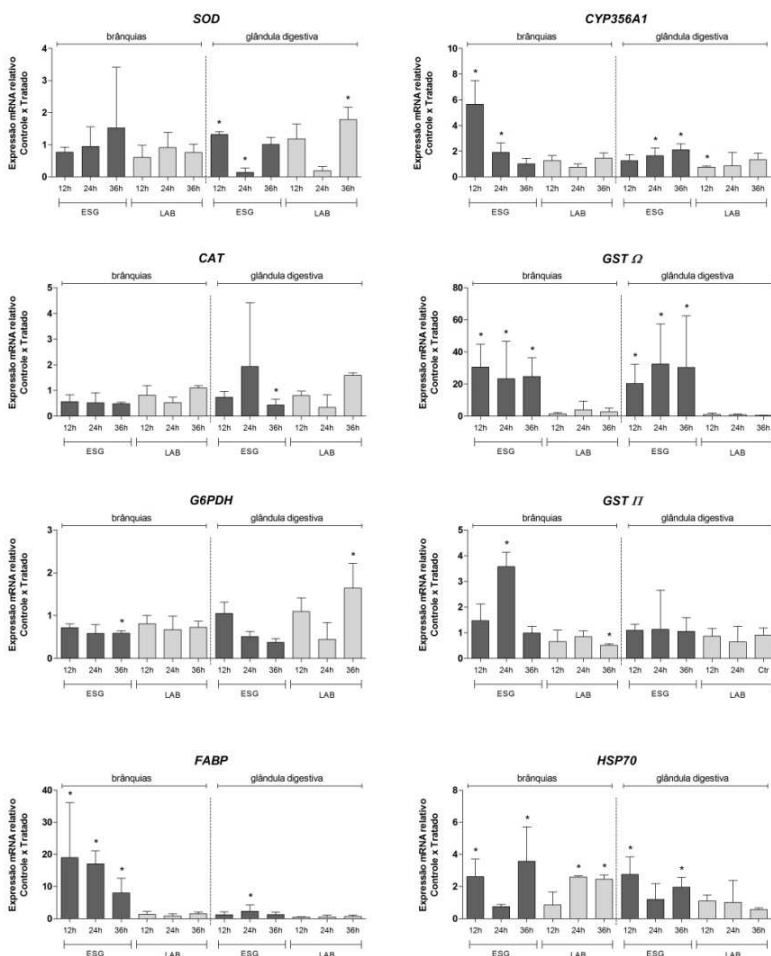


Figura 3 - Transcrição de genes em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas em diferentes tempos (12h, 24h, 36h) ao esgoto sanitário (ESG, 33%) e aos alquilbenzenos lineares (LAB, 40 µg.L⁻¹). O asterisco (*) demonstra a diferença estatística entre o tempo de exposição com seu respectivo controle (ESG x CT; LAB x CS). ($p < 0,05$). O asterisco (*) demonstra a diferença estatística entre o tempo de exposição com seu respectivo controle (ESG x CT; LAB x CS). ($p < 0,05$).

Discussão

No presente estudo foi analisada a transcrição de genes em dois tecidos de *C. gigas* expostas por 36h aos LABs e ao esgoto sanitário com coletas realizadas a cada 12 horas de exposição (12h, 24h e 36h). No final das 36h de exposição, análises de atividade de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante e de biotransformação foram realizadas, bem como a avaliação da bioacumulação de LABs nas ostras do experimento.

Ostras expostas aos LABs isoladamente e ostras expostas ao esgoto sanitário apresentaram padrões de respostas transcricionais diferentes que podem estar associadas aos diferentes níveis bioacumulados deste contaminante em cada grupo, ou à presença de outros contaminantes (ex. HPAs) no esgoto, que podem ter causado efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. As ostras expostas por 36 h não apresentaram mortalidade, indicando que o sistema de biotransformação foi capaz de compensar, em curto prazo, os possíveis efeitos deletérios dos contaminantes.

Efeitos dos LABs sobre os biomarcadores bioquímicos e moleculares

As alterações observadas nos animais expostos aos LABs sugerem uma adaptação das enzimas auxiliares do sistema antioxidante enzimático (ex. GR e G6PDH) para compensar um possível estado pró-oxidante intracelular gerado pela exposição a estes compostos.

Dentre as enzimas analisadas, a GR apresentou uma maior atividade na glândula digestiva das ostras expostas por 36h aos LABs. A GR é uma enzima dependente de NADPH, que desempenha um papel essencial na manutenção do estado redox celular, através da regeneração da GSH a partir da GSSG (SIES, 1991; VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008). A GSH funciona como antioxidante não-enzimático e como co-substrato em algumas reações antioxidantes enzimáticas catalisadas pela GST e GPx (STOREY, 1996; COSSU et al., 2000; CIRCU; AW, 2010).

É interessante observar que tanto a transcrição do gene da *G6PDH*, como a atividade da G6PDH também estavam maiores na glândula digestiva das ostras expostas aos LABs por 36h. A G6PDH é a enzima marca-passo da via das pentoses fosfato, que auxilia no

fornecimento de NADPH e, conseqüentemente na manutenção do estado redox (e. g. GSH/GSSG) (HO et al., 2013).

Estes resultados podem representar uma resposta adaptativa celular induzida pelos LABs visando prevenir contra um aumento de pró-oxidantes celulares e/ou depleção de GSH/NADPH empregados como substratos de enzimas antioxidantes e de biotransformação como a GPx e CYP450, respectivamente. Esse resultado sugere que um mecanismo de modulação gênica pode estar envolvido na regulação da atividade da G6PDH, contudo ainda não são conhecidas as proteínas nem os elementos de resposta do DNA envolvidos no mecanismo de regulação gênica da *G6PDH* em *C. gigas*.

Estudos com linhagens de células humanas mostram que a transcrição de *G6PDH* pode ser induzida por xenobióticos que causam um aumento na produção de superóxido ou diminuem a concentração de GSH (KLETZIEN; HARRIS; FOELLM, 1994; URSINI et al., 1997). Essa informação corrobora com a hipótese de aumento de pró-oxidantes e depleção de GSH em ostras expostas aos LABs e sugere que um mecanismo semelhante de modulação gênica possa ocorrer em ostras *C. gigas*.

Ainda não se conhece se isoformas de P450 são capazes de biotransformar LABs em bivalves. Nesse estudo foi avaliada a transcrição do gene *CYP356A1*, que apresentou uma diminuição da transcrição após 12 horas de exposição. Contudo, ainda permanece obscuro o mecanismo de modulação gênica dessa isoforma de CYP450.

Apesar de não terem sido observadas alterações na atividade da SOD, CAT e GPx nas ostras expostas aos LABs, houve um aumento na transcrição da *SOD* após 36 horas de exposição em glândula digestiva. A SOD é fundamental na manutenção da homeostase celular, uma vez que dismuta o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O aumento da transcrição da *SOD* pode estar relacionado ao estabelecimento de um desbalanço redox, que possivelmente ativou uma cascata de sinalização intracelular, culminando tanto com o aumento da transcrição da *SOD* quanto da *G6PDH* em glândula digestiva após 36h de exposição aos LABs. Novamente, esse resultado corrobora com a hipótese de um desbalanço redox intracelular gerado pela exposição aos LABs que foi contrabalançado por alterações na transcrição (e. g. *SOD*, *G6PDH*) e atividade enzimática (e. g. GR e G6PDH) para reestabelecer a homeostase celular.

As GSTs desempenham um papel fundamental no processo de inativação de EROs, na regulação do equilíbrio redox da célula, bem como na prevenção de danos de membrana celular e outras macromoléculas (KONINGS; PENNINGA, 1985; SIRITANTIKORN et al., 2007; KIM et al., 2009).

A atividade da GST total avaliada nesse estudo não mostrou alteração, apesar de ter sido observada uma inibição da transcrição da isoforma *GST-II* e a ausência de alteração na transcrição da *GST-Ω* nas ostras expostas aos LABs. Esse resultado indica que possivelmente a análise da atividade da GST total nas ostras expostas aos LABs, quantificada com o substrato CDNB, esteja mascarando variações na atividade de isoformas específicas de GST ou que existem mecanismos pós-transcricionais que regulam a atividade das isoformas de GST, independentemente de variações nos níveis de transcritos desses genes.

A fim de esclarecer essa questão, novas análises de cinética enzimática de diferentes isoformas de GST (ex. *GST-II* e *GST-Ω*) devem ser realizadas a fim de verificar se estas podem ser alteradas. Considerando a hipótese do estabelecimento de um estado pró-oxidante e desbalanço no estado redox nas ostras expostas aos LABs, novas análises deverão ser conduzidas, visando determinar o conteúdo de GSH, GSSG, tióis proteicos e peróxidos lipídicos.

Efeito do esgoto sanitário sobre os biomarcadores bioquímicos e moleculares

Neste experimento, brânquias de ostras expostas ao esgoto sanitário apresentaram uma maior atividade das enzimas SOD, GR e GST, demonstrando uma necessidade de manutenção da homeostase do sistema redox GSH/GSSG e de biotransformação de fase II. Este resultado é consistente com outros estudos realizados com bivalves marinhos expostos a contaminantes ambientais (SÁENZ et al., 2010; LUCHMANN et al., 2011).

A SOD é o primeiro e mais importante dos sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes contra espécies reativas de oxigênio, particularmente pela dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), impedindo a geração de radicais hidroxil altamente tóxicos (ANJU et al., 2013).

Uma vez que identificamos maiores níveis de transcritos de *GST-II* em brânquia e *GST-Ω* em ambos tecidos e maior atividade GST total

em ostras expostas ao esgoto sanitário, pode-se sugerir que, pelo menos em parte, a regulação da atividade GST ocorre em nível transcricional.

Apesar de ainda ser desconhecido o papel da GST-II em bivalves, estudos mostraram que o gene *GST-II* é transcrito em moluscos bivalves expostos aos HPAs (HORAUX et al., 2006; XU et al., 2010; MIAO et al., 2011). O gene *GST-Ω* parece proteger a célula de um processo apoptótico (SHEEHAN et al., 2001; BURG et al., 2006). Boutet, Tanguy e Moraga (2004) demonstraram uma forte indução desse gene (*GST-Ω*) em ostras *C. gigas* expostas a uma mistura de hidrocarbonetos.

Tendo em vista que neste estudo apenas foi analisada a atividade GST total, novas análises de cinética enzimática de diferentes isoformas de GST (ex. GST-II e GST-Ω) devem ser realizadas a fim de verificar quais delas são responsáveis pela alteração da atividade GST.

A glândula digestiva de ostras expostas ao esgoto sanitário apresentou um aumento em 12h e uma diminuição em 24h no nível de transcritos da *SOD*, mas nenhuma alteração foi observada após 36h, tanto no nível de transcritos, quanto na atividade enzimática da *SOD*. Uma vez que não foram realizadas análises de atividade enzimática em 12 e 24 h, não é possível saber se as alterações em nível transcricional repercutiram na atividade da *SOD* nestes tempos de exposição.

Esse resultado sugere a existência de algum controle pós-transcricional, impedindo a tradução do mRNA da *SOD* ou modulando a atividade *SOD* por meio de modificações pós-traducionais. Portanto, ainda serão necessários mais estudos para compreender os mecanismos de modulação gênica da *SOD* em ostras *C. gigas*.

CAT e GPx são conhecidos por degradar H_2O_2 e transformar em H_2O , servindo como resposta protetora frente ao estresse induzido por poluentes (CHEUNG et al., 2001; RICHARDSON et al., 2008; ZANETTE et al., 2008). Entretanto, os resultados no presente estudo mostram que o esgoto sanitário não provocou efeitos sobre a atividade destas enzimas em ambos tecidos.

Resultados semelhantes de ausência de atividade de CAT e GPx foram observados em ostras *C. brasiliensis* expostas por 36h a HPAs (LUCHMANN et al., 2011). Zanette e colaboradores (2008) observaram uma maior atividade de CAT em brânquias e glândula digestiva de ostras *C. rhizophorae* após 14 dias expostas *in situ* ao esgoto doméstico, porém o mesmo não foi observado em *C. gigas* expostas no mesmo local (ZANETTE et al., 2008). Em recente pesquisa, ostras *C. gigas* expostas *in situ* em local contaminado por 14 dias não apresentaram alterações para as enzimas CAT e G6PDH (SOUZA et al., 2012).

Em nosso estudo, além da CAT, a atividade da G6PDH não apresentou alterações nos animais expostos ao esgoto. Contudo, a transcrição da *CAT* e *G6PDH* das ostras expostas ao esgoto sanitário apresentaram uma inibição em 36h em glândula digestiva e brânquia, respectivamente. Haja vista a inexistência de alteração na atividade da CAT e G6PDH após 36 horas de exposição, pode-se especular a existência de mecanismos pós-transcricionais e traducionais regulando a atividade CAT e G6PDH.

O mecanismo de modulação gênica da *CAT* e *G6PDH*, bem como da maioria dos genes analisados neste estudo, ainda não foi estudado na ostra *C. gigas*, devendo haver mais estudos visando à elucidação dos mecanismos de modulação gênica em moluscos bivalves.

Os membros da superfamília do citocromo P450 (CYPs) estão envolvidos com o metabolismo de fase I de uma variedade de xenobióticos lipofílicos como fármacos, pesticidas e HPAs (REWITZ et al., 2006). Apesar da reconhecida diversidade de CYPs em invertebrados, existe pouca informação sobre a regulação em moluscos bivalves (ZANETTE et al., 2010).

O gene *CYP356A1* foi identificado entre a lista dos genes ativados em ostras expostas ao esgoto sanitário em laboratório e sugerido como potencial biomarcador molecular (MEDEIROS et al., 2008). A análise filogenética demonstra a estreita relação entre os *CYP356A1* com as subfamílias CYP1 (biomarcador de HPAs) e CYP17 (relacionado com o metabolismo de esteróides) (TOLEDO-SILVA et al., 2008). Entretanto, ostras expostas *in situ* em ambiente impactado por esgoto sanitário não apresentaram alteração na transcrição do gene *CYP356A1* (FLORES-NUNES et al., artigo subm. – Cap.2).

A presença de contaminantes no esgoto sanitário em uma exposição controlada de laboratório, sem as variações ambientais *in situ* (e. g. regime de marés, ventos, salinidade, temperatura), talvez possa influenciar no nível de transcrição do gene *CYP356A1*. No presente estudo foi observado um aumento da transcrição nas ostras expostas ao esgoto sanitário, corroborando com as observações de estudos anteriores em condições semelhantes de exposição (MEDEIROS et al., 2008; TOLEDO-SILVA et al., 2008).

Outro gene responsivo de destaque neste estudo foi o *FABP*. As brânquias de ostras expostas ao esgoto sanitário apresentaram níveis de transcritos de 8 até 19 vezes maior em relação ao grupo controle após 12, 24 e 36h de exposição. Pesquisas anteriores indicavam o potencial deste gene para a utilização como biomarcador de contaminação

aquática por esgoto sanitário (MEDEIROS et al., 2008 a, b; SIEBERT et al., 2009) e recentemente foi validado em experimentos *in situ* com *C. gigas* expostas em ambiente contaminado por efluentes urbanos (FLORES-NUNES et al., – artigo subm. – Cap. 2).

As FABPs são proteínas citosólicas envolvidas na absorção, transporte e compartimentalização de ácidos graxos e podem ser estimuladas, sob uma variedade de circunstâncias em que os lipídeos são mobilizados para fornecer o combustível metabólico necessário (TRAVERS et al., 2010). Os ácidos graxos funcionam tanto como fonte de energia, como sinais para a regulação metabólica, agindo através dos sistemas enzimáticos, modulando as vias de expressão de genes, crescimento, sobrevivência, respostas inflamatórias e metabólicas (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008).

Além dos ácidos graxos, as FABPs podem transportar uma variedade de compostos hidrofóbicos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (STORCH; THUMSER, 2000; ESTEVES; EHLRICH, 2006). Tendo em vista as funções das FABPs, a necessidade de energia para manutenção da homeostase intracelular pode ser um dos fatores moduladores da transcrição de *FABP* observada nas ostras expostas ao esgoto sanitário.

Além disso, as FABPs poderiam sequestrar e/ou distribuir ligantes para regular os processos de sinalização e atividade enzimática, atuando como chaperonas, tendo papel central nos processos mediados por lipídeos e relacionada com as várias vias metabólicas (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008).

HSP70, biomarcador ‘inespecífico’ em comum entre os tratamentos

O gene *HSP70* foi diferencialmente transcrito nas ostras em ambos os tratamentos. A expressão da *HSP70* desempenha um papel importante no mecanismo de citoproteção contra o H_2O_2 intracelular (FEDER; HOFMANN, 1999; WANG et al., 2012).

HSP70 tem sido mais amplamente estudada como um biomarcador de estresse (RYAN; HIGHTOWER, 1996; MUKHOPADHYAY et al., 2003) e o principal fator de indução para a regulação das *HSP70* é a ocorrência de proteínas celulares danificadas (ANANTHAN; GOLDBERG; VOELLMY, 1986). A expressão das

HSP70 é principalmente controlada em nível transcricional (CHENG et al., 2007).

A superexpressão de HSP70 protege as células contra a toxicidade, impede interações anormais proteína-proteína através do revestimento de seus sítios hidrofóbicos e promove o enovelamento apropriado ou renaturação das proteínas (VOISINE; ORTON; MORIMOTO, 2007). As HSP70 evitam a formação de agregados proteicos, podendo desnaturar agregados já formados (VOISINE; ORTON; MORIMOTO, 2007).

A maior indução de *HSP70* observada em brânquias após 24h (2,6 vezes) e 36h (2,5 vezes) pode estar relacionada com o estresse geral causado pela interação dos LABs com regiões hidrofóbicas das proteínas, possivelmente pela disponibilidade do contaminante no ambiente celular.

Proteínas desnaturadas expõem seus sítios hidrofóbicos, podendo se auto-associar e promover a agregação proteica. Estes sítios expostos podem ainda interagir com outras proteínas celulares, sequestrando-as dentro dos agregados e conduzindo para degradação. Situação semelhante possivelmente ocorre nas ostras expostas ao esgoto sanitário, onde observamos uma maior transcrição do gene *HSP70* em ambos tecidos analisados, no início e no final do experimento (12h e 36h).

Possivelmente a transcrição da *HSP70* neste estudo está relacionada com a necessidade de manutenção do sistema antioxidante das ostras expostas ao esgoto sanitário, ainda que a *HSP70* pode ter sua transcrição também influenciada por um desafio ao sistema imune (SONG et al., 2006; CHENG et al., 2007; WANG et al., 2009; YUE et al., 2011).

A regulação positiva e consistente de genes *HSP70* identificada recentemente no genoma completo da *C. gigas* sugere seu papel fundamental na defesa celular em situações de estresse variadas (ZHANG et al., 2012).

Conclusões

Os resultados observados para LABs demonstram que o contaminante possivelmente atua no desequilíbrio da homeostase celular dos animais expostos. A inexistência de estudos com organismos aquáticos marinhos demonstra a lacuna de informações nesta área.

Aparentemente, o efeito isolado da mistura de LABs em ostras é bem menor do que quando está presente no esgoto sanitário, porém existente.

A ativação do sistema GR/G6PDH e a transcrição dos genes *HSP70*, *SOD* e *G6PDH* indica uma resposta frente ao desafio químico promovido pelos LABs e necessidade da manutenção da homeostase celular. Este é o primeiro estudo de exposição de moluscos marinhos aos LABs, compostos persistentes no ambiente derivado dos detergentes domésticos e marcadores moleculares de contaminação por esgoto sanitário. A pertinência da pesquisa se dá pelo simples fato de que as empresas que comercializam esse produto no mundo (LAB) se referem a danos causados em ratos (estudos de 1991) e os efeitos toxicológicos em organismos aquáticos de água doce (*Daphnia*).

Comparando os tratamentos, apesar de identificarmos LABs no esgoto sanitário e da capacidade da ostra *C. gigas* em bioacumular estes compostos, os LABs isoladamente parecem não serem os responsáveis pelas respostas transcricionais observadas em ostras expostas ao esgoto sanitário. No entanto, cabe ressaltar que os níveis bioacumulados de LABs nos animais expostos ao esgoto foram cerca de 11 vezes menores do que aqueles detectados nos animais expostos a mistura de LABs, suficiente para influenciar na transcrição de genes nessas ostras.

O estudo demonstrou que os genes *FABP* e *GST-Ω* apresentam uma resposta imediata na ostra *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário, o que indica uma possível resposta protetora destes animais e uma importante função destes genes na manutenção da homeostase destes organismos.

A necessidade de informações sobre a influência dos contaminantes na ativação de vias metabólicas específicas em moluscos bivalves torna-se fundamental para a compreensão da modulação da transcrição gênica, das respostas observadas em biomarcadores moleculares/bioquímicos e interação entre os genes responsivos.

Agradecimentos

FFN é bolsista de doutorado do CNPq (Processo 145331/2009-1). ACDB é bolsista de produtividade do CNPq. Os autores agradecem o LMM (UFSC), pela doação de ostras utilizadas neste trabalho.

Referências bibliográficas

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

AEBI, H. Catalase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. London: Academic press, p.121-126, 1984.

ALLEN, J. I.; MOORE, M. N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 227-232, 2004.

ANANTHAN J, GOLDBERG AL, VOELLMY R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. **Science**, v. 232, p. 522-524, 1986.

ANDREW-PRIESTLEY, M. N. et al. Estrogen mediated effects in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, following field exposures to sewage effluent containing estrogenic compounds and activity. **Aquatic Toxicology**, v. 120-121, p. 99-108, 2012.

ANJU, A et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 3, p. 946-950, 2013.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.

BOONYATUMANOND, R. et al. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 942-956, 2006.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p.147-157, 2004.

BRULLE, F. et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, 1441-1453, 2008.

BURG, D. et al. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTp function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.3, p. 268-277, 2006.

BURNS, K. A.; SMITH, J. L. Biological monitoring of ambient water quality: the case for using bivalves as sentinel organisms for monitoring petroleum pollution in coastal waters. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 13, n. 4, p. 433-443, 1981.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of The Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAPUZZO, J. M. The bioaccumulation and biological effects of lipophilic organic contaminants. In: KENNEDY, V.S., NEWELL, R.EX., EBLE, A.F. (Eds.), **The Eastern oyster: *Crassostrea virginica***. Maryland Sea Grant College: Silverspring, 1996. p. 539-557, 1996.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CHENG, P. et al. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 77-87, 2007.

CHEUNG, C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3-4, p. 189-203, 2001.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

COMOGLIO, L. et al. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 382–393, 2011.

CORCORAN, E. et al. **Sick water ? The central role of wastewater management in sustainable development - a rapid response assessment**. Norway: Birkeland Trykkeri AS, 2010. p. 88

COSSU, C. et al. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 2, p. 106–121, 2000.

EDSER, C. Feedstock sourcing looks to the emerging markets. **Focus on Surfactants**, v. march, p. 1-2, 2012.

EGANHOUSE, R. P.; BLUMFIELD, D. L.; KAPLAN, I. R. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. **Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 523-530, 1983.

ESTEVEES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C**, v.142, p.262-274, 2006.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FLORES-NUNES, F. et al. O impacto do esgoto sanitário na região costeira urbanizada: influência na transcrição de genes em ostras *Crassostrea gigas*. - artigo subm. – Cap.2.

FOWLER, B. A. Molecular biomarkers: Challenges and prospects for the future. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 97, 2005.

FURUHASHI, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nature Reviews**, v. 7, n. 6, p. 489–503, 2008.

GAGNÉ, F. et al. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 2, p. 87-107, 2007.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, L. P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GUENGERICH, F. P. **Mammalian Cytochrome P450**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.

GUNTHER, A. J. et al. Long-term Bioaccumulation Monitoring with Transplanted Bivalves in the San Francisco Estuary. **Marine Pollution Bulletin** v. 38, p. 170-181, 1999

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HANSEN, B. G. et al. **European Union Risk Assessment Report: Benzene C10-13 Alkyl Derivates**. Luxembourg: Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, 2000.

HO, H. et al. Free Radical Biology and Medicine Characterization of global metabolic responses of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient hepatoma cells to diamide-induced oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 54, p. 71–84, 2013.

HOARAU, P. et al. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 196-203, 2006.

HUGGETT, R. et al. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, Lewis Publish. 347p. 1992.

HUNTER, C. L. et al. Contaminants in oysters in Kaneohe Bay, Hawaii. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, p. 646-654, 1995.

ISOBE, K. O. et al. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2448-2458, 2004.

JU, Z. et al. 2006. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 145, n. 1, 134-144, 2006.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, 494 p., 1992.

KIM, M. et al. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 152, n. 2, p. 207-213, 2009.

KLETZIEN, R. F.; HARRIS, P. K. W.; FOELLMI, L. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase : a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients , and oxidant stress. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 174–181, 1994.

KONINGS, A.W.; PENNINGA, P. On the importance of the level of glutathione and the activity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance. **International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine**, v.48, p. 409–422, 1985.

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 652–660, 2011.

MACÍAS-ZAMORA, J. V.; RAMÍREZ-ALVAREZ, N. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 2, p. 229-238, 2004.

MACLEOD, W. D. et al. **Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility**, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. 2a. Edição, U.S. Department of Commerce, NOAA/NMFS Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121p., 1986.

MAO, Y. et al. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, 2006.

MARIGÓMEZ, I. et al. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 32-48, 2013.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MEDEIROS, I.D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n.1, p. 156-157, 2008 (a).

MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362-365, 2008 (b).

MIAO, J. et al. Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to benzo[a]pyrene exposure. **Marine Genomics**, v. 4, n. 2, p. 99-108, 2011.

MOORE, M. N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, v. 552, n. 1-2, p. 247-268, 2004.

MUKHOPADHYAY, I. et al. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. **Journal Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2003.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 981-987, 2009.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Chapter 17 - Molluscs as bioindicators. *In: Trace Metals and other Contaminants in the Environment, Bioindicators & Biomonitoring - Principles, Concepts and Applications*, v. 6. p. 577-635, 2003.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

RAYMUNDO, C. C. et al. The Distribution of Linear Alkylbenzenes in Coastal and Estuarine Sediments of the Western North Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 138-146, 1992.

REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 912-922, 2002.

REWITZ, K. F. et al. Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insects analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 4, p. 363-381, 2006.

RICHARDSON, B. J. et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels "integrate" biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 503-514, 2008.

RINAWATI et al. Distribution, source identification, and historical trends of organic micropollutants in coastal sediment in Jakarta Bay, Indonesia. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217-218, p. 208–216, 2012.

ROBINSON, E. C.; NAIR, R. S. The genotoxic potential of linear alkylbenzene mixtures in a short-term test battery. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 18, p. 540–548, 1992.

ROBINSON, E. C.; SCHROEDER, R. E. Reproductive and developmental toxicity studies of a linear alkylbenzene mixture in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 18, p. 549–556, 1992.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M.J. et al. Biochemical biomarkers os pollution on the clam *Chamaelea gallina* from south-spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 542-549, 2002.

RYAN, J. A.; HIGHTOWER, L. E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. **Stress-Inducible Cellular Responses – EXS**, v. 77, p. 411-424, 1995.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14, 2006.

SÁENZ, L. A. et al. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 796–804, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SERAFIM, C.F.S.; HAZIN, F. O ecossistema costeiro. In: CHAVES, P.T. (Org.) **Geografia: o mar no espaço geográfico**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006. p. 103.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members

of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, p. 1-16, 2001.

SHERBLOM, P. M.; GSCHWEND, P. M.; EGANHOUSE, R.P. Aqueous solubilities, vapor pressures, and 1-octanol-water partition coefficients for C9-C14 linear. **Journal Of Chemical And Engineering Data**, v. 37, p. 394-339, 1992.

SIEBERT, M.N. et al. Fatty-acid binding protein, a molecular biomarker of exposure to domestic sewage in pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In: **15 th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, 2009, Bordeaux. Abstract Book**, Bordeaux, 2009, p. 472.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 31S-38S, 1991.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant Functions of Vitamins - Vitamin-E and Vitamin-C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, n., p. 7-20. 1992.

SIRITANTIKORN, A. et al. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 2, p. 592-596, 2007.

SONG, L. et al. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, n. 4, p. 335-345, 2006.

SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 153-161, 2012.

STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers. CRC Press, Boca Raton. pp. 87-206, 1994.

STORCH, J.; THUMSER, A E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 1, p. 28-44, 2000.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 12, p. 1715-1733, 1996.

TAKADA, H., ISHIWATARI, R., OGURA, N. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 35, p. 141-156, 1992.

TOLEDO-SILVA, G. et al. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 15–18, 2008.

TRAVERS, M.-A. et al. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 3, p. 289–297, 2010.

TSUTSUMI, S. et al. Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 325-331, 2002.

URSINI, M. V et al. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 323, p. 801–806, 1997.

VENKATESAN, M. I.; NORTHROP, T.; PHILLIP, C. R. Determination of linear alkylbenzenes in fish tissue by gel permeation chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 223–230, 2002.

VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. **Chemosphere**, v. 71, n. 10, p. 1977–1985, 2008.

VOISINE, C.; ORTON, K.; MORIMOTO, R. I. Protein Misfolding, Chaperone Networks, and the Heat Shock Response in the Nervous System. In: WAXMAN, S. G. (Ed.). **Molecular Neurology**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2007. p. 60–76.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, 2a edição, Londres, 309 p., 2001.

WANG, Z. et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 4, p. 639-45, 2009.

WANG, K. et al. Heat shock protein 70 inhibits hydrogen peroxide-induced nucleolar fragmentation via suppressing cleavage and down-regulation of nucleolin. **Cell Stress & Chaperones**, v. 17, n. 1, p. 121–130, 2012.

WANG, C. et al. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 91-99, 2013.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Method. Enzymol.**, v.77, p.325–333, 1981.

XU, C. et al. Cloning, characterization and tissue distribution of a pi-class glutathione S-transferase from clam (*Venerupis philippinarum*): Response to benzo[alpha]pyrene exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 160-166, 2010.

YING, G.-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v. 32, n. 3, p. 417–431, 2006.

YUE, X. et al. Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 3, p. 791–799, 2011.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-8, 2008.

ZANETTE, J. et al. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: first approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. S1–S3, 2010.

ZHANG, K. et al. Assessment of aquatic wastewater pollution in a highly industrialized zone with sediment linear alkylbenzenes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 724–730, 2012.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.

CAPÍTULO V – Conclusões finais

O fomento das atividades de aquicultura de moluscos bivalves está diretamente relacionado à utilização e a qualidade das áreas abrigadas, baías e enseadas, principalmente para a engorda de ostras, mexilhões e moluscos bivalves bentônicos, como berbigões e ameijoas.

Concomitantemente à demanda por pescado de qualidade, o adensamento das cidades litorâneas e os impactos da urbanização da zona costeira promovem danos que poderão inviabilizar o uso de baías e enseadas para a indústria aquícola.

A necessidade de gerar dados que forneçam informações sobre os efeitos dos efluentes urbanos em áreas costeiras urbanizadas é de suma importância, visto se tratar de uma mistura rica em contaminantes.

Sendo assim, destacamos que:

1. Uma vez que o esgoto sanitário é composto por várias substâncias, a quantificação de diferentes xenobióticos e a busca exaustiva por biomarcadores sensíveis se fazem necessárias para a compreensão dos danos causados por esgoto sanitário em áreas urbanas;
2. Devido à característica miscível, complexa e altamente variável do esgoto sanitário, mais do que encontrar biomarcadores específicos ao esgoto sanitário, faz-se necessária a identificação de um pacote de biomarcadores responsivos para a utilização em programas de monitoramento ambiental;
3. As *C. gigas* expostas em ambiente contaminado por esgoto sanitário apresentaram-se como ótimos organismos-sentinela, bioacumulando contaminantes, sendo indicadas para futuros programas de monitoramento ambiental;
4. As ostras *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário bioacumularam contaminantes orgânicos, principalmente HPAs e LABs;
5. Os genes *FABP* e *GST-Ω*, analisados particularmente em brânquias, mostraram-se como potenciais candidatos a biomarcadores moleculares em ostras expostas *in situ*, em região sob influência do aporte de esgoto sanitário;
6. Os resultados proteômicos observados identificaram proteínas relacionadas com citoesqueleto e estrutura celular, ubiquitinação, ciclo celular e transdução de sinal, sugerindo

que o esgoto sanitário pode promover a apoptose e interferências no sistema imune em ostras *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário;

7. As proteínas ACT2, CKAP5, UBE3C, CCNB3 e SVEP1 devem ser melhor estudadas e consideradas em estudos futuros com ostras expostas ao esgoto sanitário;
8. Apesar da capacidade da ostra *C. gigas* em bioacumular LABs, isoladamente estes compostos não parecem ser os responsáveis pelas respostas transcricionais observadas em ostras quando expostas ao esgoto sanitário;
9. Além dos LABs, a presença de outros contaminantes (ex. HPAs) no esgoto pode ter causado efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos com estes compostos;
10. As alterações observadas na atividade das enzimas dos animais expostos aos LABs sugerem uma adaptação das enzimas auxiliares do sistema antioxidante enzimático (ex. GR e G6PDH) para compensar um possível estado pró-oxidante intracelular gerado pela exposição a estes compostos;
11. O gene *CYP356A1* identificado em estudo com ostras expostas em laboratório (TOLEDO-SILVA et al., 2008) foi validado em experimento ao esgoto sanitário em ambiente controlado de laboratório (Cap.4), porém o mesmo não foi observado *in situ* (Cap. 2). As variações ambientais *in situ* (e. g. regime de marés, ventos, salinidade, temperatura), talvez possam influenciar no nível de transcrição do gene *CYP356A1*;
12. Os genes *FABP* e *GST-Ω* apresentam uma resposta imediata em tecidos de ostra *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário, o que indica uma possível resposta protetora desses animais e uma importante função desses genes na manutenção da homeostase desses organismos.

A necessidade de informações sobre a influência dos contaminantes na ativação de vias metabólicas específicas em moluscos bivalves torna-se fundamental para a compreensão da modulação da transcrição gênica, das respostas observadas em biomarcadores moleculares/bioquímicos e interação entre os genes responsivos.

Em trabalhos futuros será importante isolar os fatores, como, por exemplo a exposição a diferentes contaminantes, além de realizar

experimentos em condições controladas de laboratório, a fim de avaliar uma possível relação direta da transcrição de genes observados com contaminantes bioacumulados durante a exposição a campo.

Com a recente publicação do genoma de *C. gigas*, novos estudos poderão ser realizados, a fim de elucidar a função de diferentes proteínas expressas em condições frente aos efluentes urbanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ALLEN, J. I.; MOORE, M. N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 227-232, 2004.

AMELINA, H. et al. Proteomics-Based Method for the Assessment of Marine Pollution Using Liquid Chromatography Coupled with Two-Dimensional Electrophoresis. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 10, p. 2094-2104, 2007.

ANDREW-PRIESTLEY, M. N. et al. Estrogen mediated effects in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, following field exposures to sewage effluent containing estrogenic compounds and activity. **Aquatic Toxicology**, v. 120-121, p. 99-108, 2012.

APRAIZ, I.; CAJARAVILLE, M. P.; CRISTOBAL, S. Peroxisomal proteomics: biomonitoring in mussels after the Prestige's oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1815-1826, 2009.

BAER, W. **The Brazilian economy: Growth and development**. Boulder: Lynne Rienner Publishers, 2008. 443 p.

BAINY, A. C. D. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 411-416, 2000.

BAYEN, S.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. **Environmental Research**, v. 103, p. 375-382, 2007.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, p. 285-298, 2001.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316–1322, 2002.

BEYER, J. et al. Environmental harm assessment of a wastewater discharge from Hammerfest LNG: A study with biomarkers in mussels (*Mytilus* sp.) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1-2, p. 28-37, 2013.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229-246, 2009.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p.147–157, 2004.

BRADLEY, B. P. et al. Protein expression signatures: an application of proteomics. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 373-377, 2002.

BRULLE, F. et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, 1441-1453. 2008.

BULTELLE, F. et al. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 385-389, 2002.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of The Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAMPOS, A. et al. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4346-4359, 2012.

CAO, A. et al. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. **Aquaculture**, v. 295, n. 3-4, p. 149-156, 2009.

CAPUZZO, J. M. The bioaccumulation and biological effects of lipophilic organic contaminants. *In*: KENNEDY, V.S., NEWELL, R.EX., EBLE, A.F. (Eds.), **The Eastern oyster: *Crassostrea virginica***. Maryland Sea Grant College: Silverspring, 1996. p. 539–557, 1996.

CHEUNG, C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3-4, p. 189-203, 2001.

CHEUNG, C. C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels , *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 181-191, 2002.

CHORA, S. et al. Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 95-97, 2008.

CHORA, S. et al. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 300-308, 2009.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

COMOGLIO, L. et al. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 382–393, 2011.

CORCORAN, E. et al. **Sick water ? The central role of wastewater management in sustainable development - a rapid response assessment**. Norway: Birkeland Trykkeri AS, 2010. p. 88

CREEL, L. Ripple effects : population and coastal regions. **Population Reference Bureau**. p. 2-8, 2003.

CULLITON, T. J. Population: Distribution, Density and Growth. **National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) State of the Coast Report**. Silver Spring, MD: NOAA. 1998. Disponível em: http://oceanservice.noaa.gov/websites/retiredsites/sotc_pdf/POP.PDF

DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1558-1569, 2010.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Responses in Aquatic Animals - a Review of Determinants of Oxidative Stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1103-1123. 1989.

DUMBAULD, B. R.; RUESINK, J. L.; RUMRILL, S. S. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. **Aquaculture**, v. 290, n. 3-4, p. 196-223, 2009.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). **THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2006**. Rome, Italy, p. 180, 2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). **FAO FISHERIES AND AQUACULTURE TECHNICAL PAPER 500/1 - WORLD AQUACULTURE 2010**. Rome, Italy, p. 106, 2011.

FLEURY, E. et al. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. **BMC Genomics**, v. 10, p. 341, 2009.

FOWLER, B. A. Molecular biomarkers: Challenges and prospects for the future. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 97, 2005.

GAGNÉ, F. et al. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 2, p. 87-107, 2007.

GHEZZI, P.; BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. **Proteomics**, v. 3, 1145–1153, 2003.

GOMES, T. et al. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 79-90, 2013.

GUNTHER, A. J. et al. Long-term Bioaccumulation Monitoring with Transplanted Bivalves in the San Francisco Estuary. **Marine Pollution Bulletin** v. 38, p. 170-181, 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HALPERN, B. S. et al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948-952, 2008.

HAWKINS, S. J. et al. Recovery of polluted ecosystems: the case for long-term studies. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 215-22, 2002.

HUGGETT, R. et al. Introduction. *In*: **BIOMARKERS: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, USA, 1992.

HUNTER, C. L. et al. Contaminants in oysters in Kaneohe Bay, Hawaii. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, p. 646-654, 1995.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 10 – Dinâmica populacional e rede coletora de esgoto. *In*: **Atlas de saneamento 2011**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão / Diretoria de Geociências. Rio de Janeiro, 2011.

JONSSON, H. et al. Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutants: a combined CYP-antibody/proteomic approach. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. s-1, p. S49-S56, 2006.

JU, Z. et al. 2006. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 145, n. 1, 134-144, 2006.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, 494 p., 1992.

KLING, P. et al. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 319-327, 2008.

LARUELLE, G. G. et al. Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 9, n. 10, p. 11319–11361, 2012.

LAU, P. S.; WONG, H. L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 12, p. 1563-1572, 2003.

LEMOS, M. F. L. et al. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 873-887, 2010.

LIU, F.; WANG, W.-X. Proteome pattern in oysters as a diagnostic tool for metal pollution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 241–248, 2012.

LÓPEZ, J. L. et al. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. **Marine Biology**, v. 141, n. 2, p. 217-223, 2002.

LÓPEZ, J. L. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences**, v. 815, n. 1-2, p. 261-274, 2005.

LUCHMANN, K. H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes**

contaminantes ambientais. 2012. 178 f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

MAO, Y. et al. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, 2006.

MARIGÓMEZ, I. et al. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 32-48, 2013.

MARTINS, C. C. et al. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1359-1563, 2008.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 315-326, 2005.

MEDEIROS, I.D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n.1, p. 156-157, 2008 (a).

MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362-365, 2008 (b).

MONSINJON, T. et al. Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis*. **Proteome Science**, v. 4, n. 1, p. 17, 2006.

MOORE, M. N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, v. 552, n. 1-2, p. 247-268, 2004.

MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 59, n. 1-2, p. 1-15, 2002.

NESATYY, V. J.; SUTER, M. J. Critical Review Proteomics for the Analysis of Environmental Stress Responses in Organisms. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 20, p. 6891-6900, 2007.

OLSSON, B. et al. Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. **Hydrobiologia**, v. 514, n. 1-3, p. 15-27, 2004.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PAULY, D. et al., Chapter 18 - Marine fisheries systems. In: **Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends**. Org. Rashid M. Hassan, Robert Scholes, Neville Ash. Washington: Island Press. 917 p., 2005. Disponível no endereço <http://migre.me/foauS>

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

POYNTON, H. C.; WINTZ, H.; VULPE, C. D. Progress in ecotoxicogenomics for environmental monitoring , mode of action , and toxicant identification. **Advances in Experimental Biology**, v. 2, p. 21–75, 2008.

RAND, G.M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis. 1125 p., 1995.

REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 912-922, 2002.

RIDGWAY, J.; SHIMMIELD, G. Estuaries as Repositories of Historical Contamination and their Impact on Shelf Seas. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, n. 6, p. 903-928, 2002.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M.J. et al. Biochemical biomarkers os pollution on the clam *Chamaelea gallina* from south-spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 542-549, 2002.

RONZITTI, G. et al. Protein markers of algal toxin contamination in shellfish. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 705-713, 2008.

RUDERT, F.; GE, L.; ILAG, L. L. Functional genomics with protein-protein interactions. **Biotechnology Annual Review**, v. 5, p. 45-86, 2000.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14, 2006.

SEKOVSKI, I.; NEWTON, A.; DENNISON, W. C. Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 96, p. 48-59, 2012.

SERAFIM, C.F.S.; HAZIN, F. O ecossistema costeiro. *In*: CHAVES, P.T. (Org.) **Geografia: o mar no espaço geográfico**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006. p. 103.

SHEPARD, J. L.; BRADLEY, B. P. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 457-463, 2000.

SHEPARD, J. L. et al. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs , copper and salinity stress. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 457-463, 2000.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins - vitamin-e and vitamin-c, beta-carotene, and other carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, p. 7-20. 1992.

SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and

chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 153-61, 2012.

STOREY, K. B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1715-1733, 1996.

THOMPSON, E. L. et al. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 202-212, 2012.

TOMANEK, L. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis and development. **Annual Review of Marine Sciences**, v. 3, p. 373-399, 2011

UNESCO - IOC/UNESCO, IMO, FAO, UNDP. **A Blueprint for Ocean and Coastal Sustainability**. Paris: IOC/UNESCO. 43 p. 2011.
Disponível no endereço <http://migre.me/focgV>

United States Environmental Protection Agency (USEPA). **Occurrence of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater From Nine Publicly Owned Treatment Works**. 2009. 85p. Disponível em <http://migre.me/fmm2B>.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; HELBING, C. C. Molecular profiling of marine fauna: integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 23-38, 2012.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, 2a edição, Londres, 309 p., 2001.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic

sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-8, 2008.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.